

TENT COOPERATION TRE. Y

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)	
International application No. PCT/JP99/00954	Applicant's or agent's file reference D3-001PCT
International filing date (day/month/year) 26 February 1999 (26.02.99)	Priority date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)
Applicant OKU, Naoto et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
01 September 1999 (01.09.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Diana Nissen</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

WO 99/43752
PCT/JP99/00954

PCT

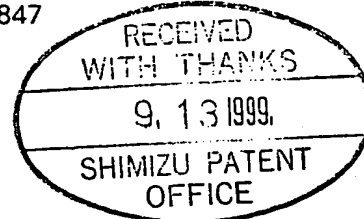
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Building 6F
1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi
Ibaraki 300-0847
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 02 September 1999 (02.09.99)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference D3-001PCT			
International application No. PCT/JP99/00954	International filing date (day/month/year) 26 February 1999 (26.02.99)	Priority date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)	
Applicant DNAVEC RESEARCH INC. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
EP,JP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
CA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 02 September 1999 (02.09.99) under No. WO 99/43752

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT COOPERATION TREATY

PCT

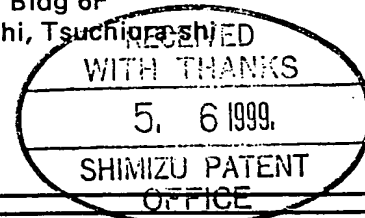
NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg 6F
1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi
Ibaraki 300-0847
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 14 April 1999 (14.04.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference D3-001PCT	International application No. PCT/JP99/00954

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

DNAVEC RESEARCH INC. (for all designated States except US)
NANGO, Manoru et al (for US)

International filing date : 26 February 1999 (26.02.99)
Priority date(s) claimed : 27 February 1998 (27.02.98)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 12 March 1999 (12.03.99)
List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : CA, JP, US

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

K. Takeda

Telephone No. (41-22) 338.83.38

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒300

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

P C T



国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP99/00954

RO105

発送日（日. 月. 年）

09.03.99

出願人又は代理人
の書類記号

D3-001PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/00954

国際出願日（日. 月. 年）

26.02.99

優先日（日. 月. 年）

27.02.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社ディナベック研究所

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、09日03月99年 に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒300

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

P C T

調査用写しの受理通知書

（法施行規則第39条）
〔PCT規則25.1〕

PCT/JP99/00954

SA202

発送日（日．月．年）

09.03.99

出願人又は代理人
の書類記号

D3-001PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/00954

国際出願日（日．月．年）

26.02.99

優先日（日．月．年）

27.02.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社ディナベック研究所

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

09 日 03 月 99 年（受理の日）

2. 国際調査報告の作成期間

国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。

3. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号 100 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C08L 79/02, A61K 45/00, 48/00, 47/48 // C12N 15/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/43752</p> <p>(43) 国際公開日 1999年9月2日(02.09.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00954</p> <p>(22) 国際出願日 1999年2月26日(26.02.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/48187 1998年2月27日(27.02.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)[JP/JP] 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 奥 直人(OKU, Naoto)[JP/JP] 〒424-0857 静岡県清水市川原町21-11 教職員住宅302号 Shizuoka, (JP) 南後 守(NANGO, Mamoru)[JP/JP] 〒466-0827 愛知県名古屋市昭和区川名山町128-4 枳中住宅1-11 Aichi, (JP) 宮崎秀樹(MIYAZAKI, Hideki)[JP/JP] 榊原裕幸(SAKAKIBARA, Hiroyuki)[JP/JP] 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: COMPOSITIONS FOR TRANSPORTING NEGATIVELY CHARGED SUBSTANCES</p> <p>(54)発明の名称 負電荷物質を輸送するための組成物</p> <p>(57) Abstract Novel transport carriers comprising polyalkylimines having two or more hydrophobic groups transferred thereinto. It is found out that use of these carriers makes it possible to transfer genes into cells at a high transfer efficiency.</p>		

複数の疎水基を導入したポリアルキルイミンを構成成分とする新規な輸送担体を構築し、この担体を利用した細胞内への遺伝子導入につき検討を行った結果、この担体を利用することにより高い導入効率で細胞内に遺伝子を導入することができるとを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	EE	エストニア	ES	スペイン	FI	フィンランド	FR	フランス	GA	ガボン	GB	英国	GE	ドイツ	GD	グアドループ	GL	グリーンランド	LV	ラトヴィア	MC	モナコ	MD	モルドバ	MG	マダガスカル	MK	マケドニア	ML	マリ	MN	モンゴル	MR	モーリタニア	MW	マラウイ	MX	メキシコ	NE	ニジェール	NL	オランダ	NO	ノルウェー	NZ	ニュージーランド	PL	ポーランド	PT	ポルトガル	RO	ルーマニア	RU	ロシア	SE	スウェーデン	SG	シンガポール	SI	スロベニア	SK	スロバキア	SL	シエラレオネ	SN	セネガル	SZ	スワジランド	TD	チュニジア	TG	トーゴ	TJ	タジキスタン	TZ	タンザニア	TM	トルクメニスタン	TR	トルコ	UA	ウクライナ	UG	ウガンダ	US	米国	UZ	ウズベキスタン	VN	ベトナム	YU	ユーゴスラビア	ZA	南アフリカ共和国	ZW	ジンバブエ
----	----------	----	------	----	-------	----	------	----	--------	----	------	----	-----	----	----	----	-----	----	--------	----	---------	----	-------	----	-----	----	------	----	--------	----	-------	----	----	----	------	----	--------	----	------	----	------	----	-------	----	------	----	-------	----	----------	----	-------	----	-------	----	-------	----	-----	----	--------	----	--------	----	-------	----	-------	----	--------	----	------	----	--------	----	-------	----	-----	----	--------	----	-------	----	----------	----	-----	----	-------	----	------	----	----	----	---------	----	------	----	---------	----	----------	----	-------

REC'D 03 MAR 2000

WIPO PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 D3-001PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/00954	国際出願日 (日.月.年) 26.02.99	優先日 (日.月.年) 27.02.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁷ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48//C12N15/00		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 01.09.99	国際予備審査報告を作成した日 16.02.00		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 村上 騎見高 印	4 J	8 8 2 7
電話番号 03-3581-1101 内線 3456			

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	3-25	有
	請求の範囲	1-2	無
進歩性(IS)	請求の範囲	18-25	有
	請求の範囲	1-17	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-25	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-2は、国際調査報告で引用された文献1(KHMELNITSKY, Y. L., et al. "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents", paragraph "MATERIALS AND METHODS", Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3(1992), p. 737-745)により新規性を有しない。文献1「Methods」の項に記載されるセチル化ポリエチレンイミンが本願明細書記載のものと同様の製造法により得られていることからみて、請求の範囲1-2は文献1記載の発明と認められる。

請求の範囲3-17は、国際調査報告で引用された文献1、国際調査報告で引用された文献2(JP, 43-8828, B(ザ・ダウ・ケミカル・コンパニー))、国際調査報告で引用された文献3(JP, 52-10400, A(インスティテュートネフテキミチエスコゴ シンテザ イメニ エイ. ヴィ. トプチュヴァ アカデミイ ナウク エスエスエスアール))及び国際調査報告で引用された文献4(JP, 59-86626, A(インスティテュート・ネフテキミチエスコゴ・シンテザ・イメニ・エー・ブイ・トプチエバ・アカデミー・ナウク・エスエスエスアール))により進歩性を有しない。文献1「Methods」の項に記載されるセチル化ポリエチレンイミンの原料として文献2-4記載のものを用いて請求項3-17記載の組成物を得ることは当業者が容易になし得たことである。

PCT

EP



国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)
[PCT 18 条、PCT 規則 43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 D3-001PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/00954	国際出願日 (日.月.年) 26.02.99	優先日 (日.月.年) 27.02.98
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (PCT 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48//
C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48//
C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	KHMELNITSKY, Y. L., et al. "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents", paragraph "MATERIALS AND METHODS", Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3 (1992), p. 737-745	1 - 2 3 - 17 18 - 25
A	ZANTA, M. A., et al. "In Vitro Gene Delivery to Hepatocytes with Galactosylated Polyethylenimine", Bioconjugate Chem., Vol. 8, No. 6 (1997), p. 839-844	1 - 25
Y A	JP, 43-8828, B (ザ・ダウ・ケミカル・コンパニー), 8. 4月. 1968 (08. 04. 68) (ファミリーなし)	3 - 17 1 - 2, 18 - 25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 04. 99

国際調査報告の発送日

11.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高

4 J

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 6833

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP, 52-10400, A (インスティテュート ネフテキミチ エスコゴ シンテザ イメニ エイ. ヴィ. トプチュヴァ アカデ ミイ ナウク エスエスエスアール), 26. 1月. 1977 (2 6. 01. 77) & GB, 1459809, A&DE, 25300 42, A&US, 4032480, A	3-17 1-2, 18-25
Y A	JP, 59-86626, A (インスティテュート・ネフテキミチエ スコゴ・シンテザ・イメニ・エー・ブイ・トプチエバ・アカデミー ・ナウク・エスエスエスアール), 18. 5月. 1984 (18. 05. 84) & DE, 3237663, A&GB, 212862 5, A&US, 4467115, A	3-17 1-2, 18-25

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	官庁記入欄
国際出願日	PCT 26.2.99 受理印
(受付印)	
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	D3-001PCT

第 I 欄 発明の名称

負電荷物質を輸送するための組成物

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

株式会社ディナベック研究所
DNAVEC RESEARCH INC.
〒305-0856 日本国茨城県つくば市観音台1丁目25番11号
25-11, Kannondai 1-chome, Tsukuba-shi,
IBARAKI 305-0856 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

奥 直人
OKU Naoto
〒424-0857 日本国静岡県清水市川原町21-11
教職員住宅302号
302, Kyouisyokuinjyutaku, 21-11, Kawahara-cho, Shimizu-shi,
SHIZUOKA 424-0857 JAPAN

この欄に記載した者は
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

10297 弁理士 清水 初志 SHIMIZU Hatsushi
10877 弁理士 橋本 一憲 HASHIMOTO Kazunori
〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F,
1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, IBARAKI 300-0847 JAPAN

電話番号:

0298-41-2001

ファクシミリ番号:

0298-41-2009

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続表を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

南後 守

NANGO Mamoru

〒466-0827 日本国愛知県名古屋市昭和区川名山町128-4

杵中住宅1-11

1-11, Irinakajyutaku, 128-4, Kawanayama-cho, Syowa-ku,

Nagoya-shi, AICHI 466-0827 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

宮崎 秀樹

MIYAZAKI Hideki

〒305-0856 日本国茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

株式会社ディナベック研究所内

c/o DNAVEC Research Inc., 25-11, Kannondai 1-chome,

Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0856 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

榊原 裕幸

SAKAKIBARA Hiroyuki

〒305-0856 日本国茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

株式会社ディナベック研究所内

c/o DNAVEC Research Inc., 25-11, Kannondai 1-chome,

Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0856 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名):

住所(国名):

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。

第Ⅴ欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う（該当する□にレ印を付すこと：少なくとも1つの□にレ印を付すこと）。

広域半字番号

- ☐ AP ARIPO半字番号：GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ EA ユーラシア半字番号：AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ EP ヨーロッパ半字番号：AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ OA OAPI半字番号：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

国内半字番号（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia |
| <input type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input type="checkbox"/> NZ ニュー・ジールランド New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input type="checkbox"/> CN 中国 China | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input type="checkbox"/> SL シェラ・レオネ Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> JP 日本 Japan | <input type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | <input type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

確認の指定の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

第VI欄 優先権主張

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 27.02.98	平成10年特許願 第48187号	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

☒ 上記()の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の()の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

(1)

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

ISA/J P

先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日、月、年）

出願番号

国名（又は広域官庁）

第VIII欄 照合欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書	4	枚
明細書（配列表を除く）	52	枚
請求の範囲	5	枚
要約	1	枚
図面	16	枚
明細書の配列表		枚
合計	78	枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- | | |
|---|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 | 5. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第VI欄の()の番号を記載する） |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 | 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する） |
| <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 | 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面 |
| 2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 8. <input type="checkbox"/> ヌクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク） |
| 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し | 9. <input checked="" type="checkbox"/> その他（書類名を詳細に記載する） |
| 4. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書 | |

優先権書類送付請求書

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名：日本語

第IX欄 提出者の記名押印

提出者の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

弁理士 清水 初志



弁理士 橋本 一憲



1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

受理官庁記入欄

3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された
国際調査機関

ISA/J P

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に
調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式PCT/RO/101（最終用紙）（1998年7月）

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/00954

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48//
C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48//
C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	KHMELNITSKY, Y. L., et al. "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents", paragraph "MATERIALS AND METHODS", Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3 (1992), p. 737-745	1-2 3-17 18-25
A	ZANTA, M. A., et al. "In Vitro Gene Delivery to Hepatocytes with Galactosylated Polyethylenimine", Bioconjugate Chem., Vol. 8, No. 6 (1997), p. 839-844	1-25
Y A	JP, 43-8828, B (ザ・ダウ・ケミカル・コンパニー), 8. 4月. 1968 (08. 04. 68) (ファミリーなし)	3-17 1-2, 18-25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 04. 99

国際調査報告の発送日

11.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高

4J

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 6833

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP, 52-10400, A (インスティテュート ネフテキミチ エスコゴ シンテザ イメニ エイ. ヴィ. トプチュヴァ アカデ ミイ ナウク エスエスエスアール), 26. 1月. 1977 (2 6. 01. 77) & GB, 1459809, A&DE, 25300 42, A&US, 4032480, A	3-17 1-2, 18-25
Y A	JP, 59-86626, A (インステイチュート・ネフテヒミチエ スコゴ・シンテザ・イメニ・エー・ブイ・トプチエバ・アカデ ミイ・ナウク・エスエスエスアール), 18. 5月. 1984 (18. 05. 84) & DE, 3237663, A&GB, 212862 5, A&US, 4467115, A	3-17 1-2, 18-25



予備審査請求は管轄国際予備審査機関へ直接行わなければならない。
IPEA/JIP

特許協力条約に基づく国際出願
国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。



国際予備審査機関記入欄

国際予備審査機関の確認		請求書の受理の日	
第 I 欄 国際出願の表示		出願人又は代理人の書類記号 D 3-001-PCT	
国際出願番号 PCT/J P 99/00954	国際出願日 (日. 月. 年) 26.02.99	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 27.02.98	
発明の名称 負電荷物質を輸送するための組成物			

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 株式会社ディナベック研究所 DNAVEC RESEARCH INC. 〒305-0856 日本国茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 25-11, Kannondai 1-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0856 JAPAN	電話番号: ファクシミリ番号: 加入電話番号:
---	---------------------------------------

国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 奥 直人 OKU Naoto 〒424-0857 日本国静岡県清水市川原町 2 1 - 1 1 教職員住宅 3 0 2 号 302, Kyouisyokuinjyutaku, 21-11, Kawahara-cho, Shimizu-shi, SHIZUOKA 424-0857 JAPAN	

国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 南後 守 NANGO Mamoru 〒466-0827 日本国愛知県名古屋市昭和区川名山町 1 2 8 - 4 杵中住宅 1 - 1 1 1-11, Irinakajyutaku, 128-4, Kawanayama-cho, Syowa-ku, Nagoya-shi, AICHI 466-0827 JAPAN	

国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が続葉に記載されている。	

国際出願番号

PCT/JP99/00954

2頁

第II欄の続き 出願人

この第II欄の続きを使用しないときは、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

宮崎 秀樹

MIYAZAKI Hideki

〒305-0856 日本国茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

株式会社ディナベック研究所内

c/o DNAVEC Research Inc., 25-11, Kannondai 1-chome,

Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0856 JAPAN

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

榊原 裕幸

SAKAKIBARA Hiroyuki

〒305-0856 日本国茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

株式会社ディナベック研究所内

c/o DNAVEC Research Inc., 25-11, Kannondai 1-chome,

Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0856 JAPAN

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍(国名):

住所(国名):

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍(国名):

住所(国名):

☐ その他の出願人が他の続葉に記載されている。

第III欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であつて、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

10297 弁理士 清水 初志 SHIMIZU Hatsushi

10877 弁理士 橋本 一憲 HASHIMOTO Kazunori

〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階

Kantetsu Tsukuba Bldg.6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi,

IBARAKI 300-0847 JAPAN

電話番号:

0298-41-2001

ファクシミリ番号:

0298-41-2009

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第IV欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述: *

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正(添付した説明書も含む)を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲について行った補正を無視し、かつ、取り消されたものとみなして開始することを希望する。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過後まで延期されることを希望する(ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く(規則69.1(d))。)
(この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。)

* 記入がない場合は、1) 補正がない又は国際予備審査機関が補正(原本又は写し)を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2) 国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正(原本又は写し)を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は、日本語であり、

☒ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第V欄 国の選定

出願人は、選定資格のある全ての指定国(即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第2章に拘束されている国)を選定する。

ただし、出願人は次の国の選定を希望しない:

第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

国際予備審査機関記入欄

受 領 未 受 領

1. 国際出版の翻訳文..... 枚

2. 特許協力条約第34条の規定に基づく修正書..... 枚

3. 特許協力条約第19条の規定に基づく修正書..... 枚

4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書..... 枚

5. 書簡..... 枚

6. その他（書類名を具体的に記載する）： 枚

国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙 3. ☐ 包括委任状の写し
- ☒ 納付した手数料に相当する特許印紙を 4. ☐ 記名押印（署名）に関する説明書
- ☒ 国際事務局の口座への振込を証明する書面 5. ☐ スクレスチッド又はアミノ酸配列表
（スクレスチッドディスク）
2. ☐ 別個の記名押印された委任状 6. ☐ その他（書類名を具体的に記載する）：

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

弁理士 清水 初志



弁理士 橋本 一憲



国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付


3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。 ☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日：

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人 清水 初志	
あて名 〒 300-0847	
茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所	

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）
〔PCT規則71.1〕

発送日 （日.月.年）	29.02.00
----------------	----------

出願人又は代理人 の書類記号 D3-001PCT	重要な通知
-----------------------------	-------

国際出願番号 PCT/J P99/00954	国際出願日 （日.月.年） 26.02.99	優先日 （日.月.年） 27.02.98
---------------------------	---------------------------	-------------------------

出願人（氏名又は名称） 株式会社ディナベック研究所

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名 日本国特許庁（IPEA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特 許 庁 長 官	4 J	8 8 2 7
	電話番号 03-3581-1101 内線 3456		

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 D3-001PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/00954	国際出願日 (日.月.年) 26.02.99	優先日 (日.月.年) 27.02.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl. ⁷ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48//C12N15/00		
出願人(氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u> </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 01.09.99	国際予備審査報告を作成した日 16.02.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 村上 騎見高 印	4 J 8827
電話番号 03-3581-1101 内線 3456		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | |
|-------------------------------------|---|-------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | | |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | | |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | | |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	3 - 25	有
	請求の範囲	1 - 2	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	18 - 25	有
	請求の範囲	1 - 17	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 25	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1-2は、国際調査報告で引用された文献1 (KHMELNITSKY, Y. L., et al. "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents", paragraph "MATERIALS AND METHODS", Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3 (1992), p. 737-745) により新規性を有しない。文献1「Methods」の項に記載されるセチル化ポリエチレンイミンが本願明細書記載のものと同様の製造法により得られていることからみて、請求の範囲1-2は文献1記載の発明と認められる。

請求の範囲3-17は、国際調査報告で引用された文献1、国際調査報告で引用された文献2 (JP, 43-8828, B (ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー))、国際調査報告で引用された文献3 (JP, 52-10400, A (インスティテュート・ネフテキミチエスコゴ・シンテザ・イメニ・エイ・ヴィ・トプチュヴァ・アカデミイ・ナウク・エスエスエスアール)) 及び国際調査報告で引用された文献4 (JP, 59-86626, A (インスティテュート・ネフテヒミチエスコゴ・シンテザ・イメニ・エー・ブイ・トプチエバ・アカデミー・ナウク・エスエスエスアール)) により進歩性を有しない。文献1「Methods」の項に記載されるセチル化ポリエチレンイミンの原料として文献2-4記載のものを用いて請求項3-17記載の組成物を得ることは当業者が容易になし得たことである。

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

清水 初志

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所



PCT見解書

(法第13条)
[PCT規則66]

発送日
(日.月.年)

30.11.99

出願人又は代理人
の書類記号

D3-001PCT

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/J P99/00954

国際出願日

(日.月.年)

26.02.99

優先日

(日.月.年)

27.02.98

国際特許分類 (IPC) Int. Cl.⁶ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00,
A61K47/48//C12N15/00

出願人 (氏名又は名称)

株式会社ディナベック研究所

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に回答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

回答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 27.06.00 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高

4 J

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 3456

I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条（PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	3-25	有
	請求の範囲	1-2	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	18-25	有
	請求の範囲	1-17	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-25	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

請求の範囲1-2は、国際調査報告で引用された文献1 (KHMELNITSKY, Y. L., et al. "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents", paragraph "MATERIALS AND METHODS", Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3 (1992), p. 737-745) により新規性を有しない。文献1「Methos」の項に記載されるセチル化ポリエチレンイミンが本願明細書記載のものと同様の製造法により得られていることからみて、請求の範囲1-2は文献1記載の発明と認められる。

請求の範囲3-17は、国際調査報告で引用された文献1、国際調査報告で引用された文献2 (JP, 43-8828, B (ザ・ダウ・ケミカル・コンパニー))、国際調査報告で引用された文献3 (JP, 52-10400, A (インステイテュート・ネフテキミチエスコゴ・シンテザ・イメニ・エイ・ヴィ・トプチュヴァ・アカデミー・ナウク・エスエスエスアール)) 及び国際調査報告で引用された文献4 (JP, 59-86626, A (インステイチュート・ネフテキミチエスコゴ・シンテザ・イメニ・ヤー・ブイ・トプチュエバ・アカデミー・ナウク・エスエスエスアール)) により進歩性を有しない。文献1「Methos」の項に記載されるセチル化ポリエチレンイミンの原料として文献2-4記載のものを用いて請求項3-17記載の組成物を得ることは当業者が容易になし得たことである。

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

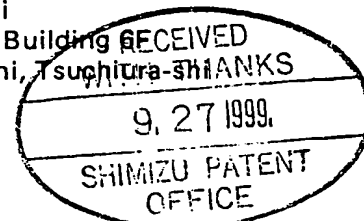
INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Building
1-1-1, Oroshi-machi, Tsukuba-shi
Ibaraki 300-0847
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)		
Applicant's or agent's file reference D3-001PCT		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP99/00954	International filing date (day/month/year) 26 February 1999 (26.02.99)	Priority date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)
Applicant Dनावेक रिसर्च इन्क. एत अल		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : CA, JP, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

None

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Diana Nissen Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

清水 初志

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所



殿

P C T

国際予備審査請求書の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、実施細則601(a)〕

PCT/JP99/00954

PE402

発送日（日、月、年）

14.09.99

出願人又は代理人
の書類記号

D3-001PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/00954

国際出願日（日、月、年）

26.02.99

優先日（日、月、年）

27.02.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社ディナベック研究所

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

01日09月99年

2. この受理の日は次に示す日である。

- ☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則61.1(b)）
- ☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則59.3(e)）
- ☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）



出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階

P C T

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)
[P C T規則44.1]

発送日
(日.月.年)

11.05.99

出願人又は代理人
の書類記号

D3-001PCT

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JP99/00954

国際出願日
(日.月.年)

26.02.99

出願人（氏名又は名称）

株式会社ディナベック研究所

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出
出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる（PCT規則46参照）。
いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。
詳細については添付用紙の備考を参照すること。
どこへ 直接次の場所へ
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35
詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。
2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
3. ☐ 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。
☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。
☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。
4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。
優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。
出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。
国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第Ⅱ章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）
郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 J

8 8 2 7

電話番号 03-3581-1101 内線 6833

様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいて請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく。（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直すなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/ISA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 D 3 - 0 0 1 P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 0 9 5 4	国際出願日 (日.月.年) 2 6 . 0 2 . 9 9	優先日 (日.月.年) 2 7 . 0 2 . 9 8
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48//
C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48//
C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	KHMELNITSKY, Y. L., et al. "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents", paragraph "MATERIALS AND METHODS", Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3 (1992), p. 737-745	1 - 2 3 - 17 18 - 25
A	ZANTA, M. A., et al. "In Vitro Gene Delivery to Hepatocytes with Galactosylated Polyethylenimine", Bioconjugate Chem., Vol. 8, No. 6 (1997), p. 839-844	1 - 25
Y A	J P, 43-8828, B (ザ・ダウ・ケミカル・コンパニー), 8. 4月. 1968 (08. 04. 68) (ファミリーなし)	3 - 17 1 - 2, 18 - 25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 04. 99

国際調査報告の発送日

11.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高

印

4 J

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 6833

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	J P, 52-10400, A (インスティテュート ネフテキミチ エスコゴ シンテザ イメニ エイ. ヴィ. トプチュヴァ アカデ ミイ ナウク エスエスエスアール), 26. 1月. 1977 (2 6. 01. 77) & GB, 1459809, A&DE, 25300 42, A&US, 4032480, A	3-17 1-2, 18-25
Y A	J P, 59-86626, A (インステイチユト・ネフテヒミチエ スコゴ・シンテザ・イメニ・エー・ブイ・トプチエバ・アカデミー ・ナウク・エスエスエスアール), 18. 5月. 1984 (18. 05. 84) & DE, 3237663, A&GB, 212862 5, A&US, 4467115, A	3-17 1-2, 18-25

PATENT COOPERATION TREATY

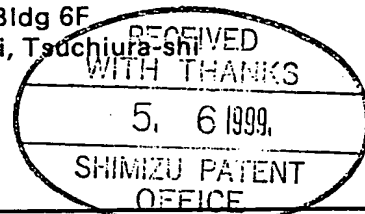
PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg 6F
1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi
Ibaraki 300-0847
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 21 April 1999 (21.04.99)	
Applicant's or agent's file reference D3-001PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP99/00954	International filing date (day/month/year) 26 February 1999 (26.02.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)
Applicant DNAVEC RESEARCH INC. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
27 Febr 1998 (27.02.98)	10/48187	JP	16 Apr 1999 (16.04.99)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Carlos Naranjo Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

002579328



(51) 国際特許分類 C08L 79/02, A61K 45/00, 48/00, 47/48 // C12N 15/00	A1	(11) 国際公開番号 WO99/43752 (43) 国際公開日 1999年9月2日(02.09.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00954 (22) 国際出願日 1999年2月26日(26.02.99) (30) 優先権データ 特願平10/48187 1998年2月27日(27.02.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JP) 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 奥 直人(OKU, Naoto)(JP/JP) 〒424-0857 静岡県清水市川原町21-11 教職員住宅302号 Shizuoka, (JP) 南後 守(NANGO, Mamoru)(JP/JP) 〒466-0827 愛知県名古屋市昭和区川名山町128-4 枳中住宅1-11 Aichi, (JP) 宮崎秀樹(MIYAZAKI, Hideki)(JP/JP) 榊原裕幸(SAKAKIBARA, Hiroyuki)(JP/JP) 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP)		(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: COMPOSITIONS FOR TRANSPORTING NEGATIVELY CHARGED SUBSTANCES (54)発明の名称 負電荷物質を輸送するための組成物 (57) Abstract Novel transport carriers comprising polyalkylimines having two or more hydrophobic groups transferred thereinto. It is found out that use of these carriers makes it possible to transfer genes into cells at a high transfer efficiency.		

複数の疎水基を導入したポリアルキルイミンを構成成分とする新規な輸送担体を構築し、この担体を利用した細胞内への遺伝子導入につき検討を行った結果、この担体を利用することにより高い導入効率で細胞内に遺伝子を導入することができることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ		共和国	TR	トルコ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア				
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン				
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KR	韓国	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		
				RU	ロシア		

明細書

負電荷物質を輸送するための組成物

技術分野

本発明は、負電荷物質を細胞内へ輸送するための組成物に関する。

背景技術

薬物治療において、薬物を目的とする細胞又は細胞内組織に到達させるシステム、すなわちドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; 以下単に「DDS」と称する) は重要な技術である。遺伝子治療においても、DDS を利用して遺伝子を所望の細胞に導入することが中心的な技術であることは言うまでもない。細胞内に遺伝子を導入するための方法は大きく二つに分類することができる。

一つは、ウイルスベクターを用いる方法である。これには、所望の外来性遺伝子をゲノム上に有するウイルスを感染させることにより、内部の核酸を細胞内に導入するという方法が含まれる。もう一つは、人工的なまたは半人工的な輸送担体 (キャリアー) に、所望の遺伝子または該遺伝子を含むベクターを封入または担持させる方法である。この方法は、目的物の生体内挙動および輸送に関与する諸過程を、キャリアー自体の物理化学的性質に依存させることにより、生理活性物質を所望の臓器 (標的臓器)、細胞 (標的細胞) または細胞内器官 (標的器官) に到達せしめることを特徴とする。この方法におけるキャリアーとしては例えば、リボソーム (F. Ledley et al., Human Gene Therapy 6, 1129-1144 (1995))、タンパク質 (Human Gene Therapy 5, 429 (1994))、ペプチド (Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America 90, 893

(1993))、合成高分子化合物 (Tang et al., Human Gene Therapy 4, 823-832 (1997))、および (再構成) センダイウイルス (Exp. Cell Res. 159, 399 (1985))などを例示することができる。

キャリアとしてリボソームを用いる方法には、様々な工夫が施されてきた。近年、DNA分子がポリアニオンであることに着目し、DNA分子と静電的に親和性を有し、容易に複合体を形成できるカチオン性脂質をリボソームとして用い、標的細胞に該DNA分子を導入する試みがなされている。このようなカチオン性脂質としては、リポフェクチン、1、2-ジオレイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン (DOTAP)、1、2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE) (F. Ledley et al., Human Gene Therapy 6, 1129-1144 (1995))、トランスフェクタム等が知られている。しかしながら、カチオン性脂質はエンドサイトーシス過程を経て細胞内に取り込まれるとリソソーム等により分解されやすく、遺伝子の導入効率が低いという問題があった。

これらの問題を解決するために、カチオン性高分子を用いる試みもなされている。例えば、Kimらはポリリジンに疎水基を結合させ、これを疎水性相互作用により血漿タンパク質へ導入後、DNA分子と静電的に結合させる遺伝子導入システムを開示している (米国特許第 5,679,559 号)。また、Zhouらは疎水基を導入したポリリジンとリン脂質からなるリボソームを調製した (X. Zhou et al., Biochimica et Biophysica Acta. 1065, 8-14 (1991), X. Zhou et al., ibid. 1189, 195-203 (1994))。Zhouらのリボソームは、ポリ-L-リジンを用いることにより細胞傷害性を低減させ、脂質残基を導入することにより標的細胞へのDNA/リボソーム複合体の親和性を向上させることに成功した。しかしながら、細胞へ効率良く導入するためには、細胞を予め化学物質

で処理することが必要であった。また、国際公開第 97/45442 号パンフレットにおいては、コレステロール基を導入したポリアミンを含むリボソームを開示している。

その他のカチオン性高分子として、ポリアルキレンイミン、特にポリエチレンイミン (PEI) が知られている (N. Oku et al., J. Biochem. 100, 935-944 (1986), N. Oku et al., Biochemistry 26, 8145-8150 (1987), Suh et al., Bioorganic Chem. 22, 318-327 (1994))。ポリエチレンイミンは直鎖または分岐型のポリマー分子であり、その分子中にプロトン化したアミノ基を有し、これを介して DNA 分子と結合することができ、また、細胞標的物質または細胞膜変性剤を用いる必要がないことから、遺伝子導入において応用されている (W096/02655, O. Boussif et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7297-7301 (1995), B. Abdallah et al., Hum. Gene Ther. 7, 1947-1954 (1996), Lambert et al., Mol. Cell Neurosci. 7, 239-246 (1996), R. Kircheis et al., Gene Ther. 4, 409-418 (1997), A. Baker et al., Gene Ther. 4, 773-782 (1997), A. Baker et al., Nucleic Acids Res. 25, 1950-1956 (1997), Durmort et al., Gene Ther. 4, 808-814 (1997), Tang et al., Gene Ther. 4, 823-832 (1997), A. Boletta et al., Hum. Gene Ther. 8, 1243-1251 (1997), Ferrari et al., Gene Ther. 4, 1100-1106 (1997))。ポリエチレンイミンの細胞内導入機構について、Demeneix らによる仮説が報告されている (Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery, ed. by P. L. Felgner et al., p. 146-151, ACS conference proceeding series, 1996)。

一方、遺伝子導入能を示すカチオン性リボソーム (またはリボプレックス) 構成脂質において極性基にスベルミン構造を有する化合物には、先に述べたトランスフェクタム (J.-P. Behr et al., Proceedings of National Academy of Science of United States of America 86, 6982

(1989)、あるいは DOGS [PROMEGA])、リボフェクタミン ([Gibco BRL]、あるいは DOSPA、P. H-Nelson et al., FOCUS 15、 73 (1993))、セルフェクチン ([Gibco BRL]、あるいは TM-TPS、Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery, ed. by P. L. Felgner et al., p.169-176, ACS Conference Proceeding Series, 1996)、GL67 (あるいは #67) 類縁化合物 (E.R.Lee et al., Human Gene Therapy 7, 1701 (1995))、RPR 120535 関連化合物 (W097/18185、G. Byk et al., Tetrahedron Lett., 38, 3219 (1997)) などが知られている。

しかしながら、疎水基を導入したポリエチレンイミンまたは分子量分布を有しないポリエチレンイミン関連構造類縁体を遺伝子導入のための担体として用いた報告例はない。またスベルミンを多分子連結した部分構造をベースとした単一の誘導体による遺伝子送達の報告例もない。

発明の開示

本発明は、負電荷を有する物質の細胞内への導入において、より導入効率が高く、細胞に対して毒性の少ない、カチオン性高分子を構成成分とする組成物、および該組成物を用いた負電荷を有する物質の細胞内への導入法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために、複数の疎水基を導入したポリアルキレンイミンを構成成分とする新規な輸送担体を構築し、この担体を利用した細胞内への遺伝子導入につき検討を行った結果、この担体を利用することにより高い導入効率で、かつ極めて少ない毒性で、細胞内に遺伝子を導入することができることを見出した。

具体的には、本発明者らは、ポリエチレンイミンに複数のセチル基を導入し、図 1 に示すセチル化ポリエチレンイミンを調製し、これにリン脂質であるホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリ

ンを混合して、担体組成物を調製した。そして、得られた組成物に蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が挿入されたプラスミドを混合し、これにより形成させた複合体を COS-1 細胞に導入して、蛍光強度の測定による遺伝子導入効率の検討、および生細胞の細胞密度の測定による細胞毒性の検討を行った。その結果、セチル化ポリエチレンジミンを構成成分とする担体組成物を用いた場合には、従来用いられていたリボソームを用いた場合と比較して、顕著に遺伝子導入効率が高く、しかも細胞に対する毒性が極めて低いことを見出した。

次いで、本発明者らはポリエチレンジミンの分子量とアルキル基の長さ、および、アルキル基の導入率の異なる 9 種の化合物を合成し遺伝子発現との関連を検討した (図 7、図 8)。その結果、これら分岐型のポリエチレンジミンの検討では分子量 600 付近、アルキル基はセチル基が *in vitro* 遺伝子発現に好適であることを見出した (表 1)。また、この化合物は遺伝子導入過程で血清の影響を受け難いことが明らかとなった。セチル化ポリエチレンジミン (ポリエチレンジミンの分子量は約 600) を DNA と直接複合体を形成させ HepG2 細胞に遺伝子導入した時、50%血清存在下で、従来高い遺伝子導入試薬として知られているリボフェクトアミンの 10 倍以上高い遺伝子発現を示した (表 1)。また、リボソームとして用いた時、正常ウシ脳血管内皮細胞 (BBMC) に対してリボフェクトアミンの 200 倍以上高い遺伝子発現を示した (表 2)。

上記の化合物は分子量分布をもつ市販のポリエチレンジミンを出発原料としているため構造が不均一である。また、アルキル基の導入率を合成的に厳密にコントロールするのが難かしく、アルキル基の結合位置を確定できないという問題をもつ。そこで、構造を確定できる化合物を新たにデザインし合成した。一つはテトラエチレンペンタミンを出発原料とした 3 種のアルキル化直鎖エチレンジミン (図 11)、他の一つはス

ベルミンを出発原料とした 5 種のアルキル化直鎖スベルミン(図 16)。これら新規化合物の遺伝子発現は期待通り高く、いずれの場合もセチル基を導入した化合物が優れていた。HepG2 細胞に対し血清存在下で、セチル化直鎖エチレンイミンおよびセチル化直鎖スベルミンは 10 倍以上高い発現を示した(表 3、表 4)。また、血清非存在下で、オクチル化直鎖スベルミンは、セチル化直鎖スベルミンと同様に高い遺伝子発現を示した(表 4)。

上記は *in vitro* の遺伝子導入能の結果である。通常、非ウイルスベクターは *in vitro* の結果が *in vivo* に反映せず、*in vivo* の遺伝子発現は非常に低い問題を抱える。例えば、先行のカチオニックリボソーム(リポフェクトアミン、DC-Chol/DOPE) はマウス皮下担癌モデルの腫瘍内投与で naked DNA より遺伝子発現は低いと報告されている(Gene Ther 1996, 3, 542-548)。そこで、ヒト膵臓癌細胞および神経膠芽腫細胞をマウス皮下に移植した担癌モデルを作製し、このモデルに対する遺伝子発現を検討した。結果は上記と同様、セチル化直鎖エチレンイミン、セチル化直鎖スベルミンに加えてオクチル化直鎖エチレンイミン、オクチル化直鎖スベルミン誘導体が naked DNA と比べて明らかに強い遺伝子発現を示した(表 5)。

以上、本発明者らはアルキル化分岐ポリエチレンイミンが、特にリボソームにした時、血清存在下で優れた遺伝子導入能を示すことを見出した。また、これに基づき、更に、アルキル化直鎖エチレンイミン、アルキル化直鎖スベルミンを合成し、遺伝子発現を検討した結果、セチルおよびオクチルを 2 ケ導入した誘導体は DNA との複合体とした時、*in vivo* で優れた遺伝子発現を示すことを見出した。

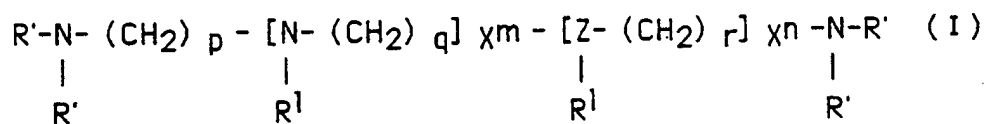
即ち、本発明は、複数の疎水基を導入したポリアルキレンイミンまたはその塩を構成成分とする組成物、および該組成物を用いた遺伝子導入

法に関し、より具体的には、

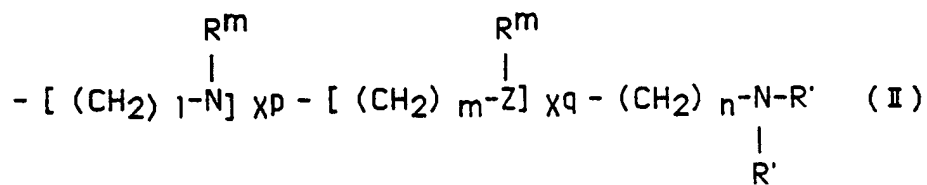
(1) 疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含む組成物、

(2) 疎水基がコレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、またはリン脂質残基である、(1)に記載の組成物、

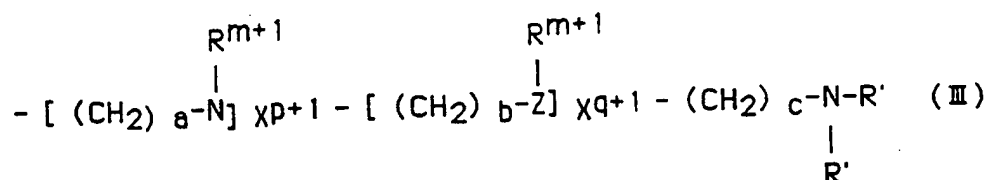
(3) 疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンが下記構造式(I)で表される化合物である、(1)に記載の組成物、



(式中、基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、Zは炭素原子もしくは窒素原子を表し、R'は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つのR'は同一であっても異なってもよく、側鎖R¹は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式(II)を表す。また、式中、p、q、r、Xⁿ、X^mは任意の自然数を表す。)

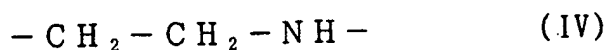


(式中、基本骨格および側鎖 R^m にアミド結合が含まれていてもよく、 Z は炭素原子もしくは窒素原子を表し、 R' は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する 2 つの R' は同一であっても異なってもよく、 R^m は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式 (III) を表す。また、式中、 l 、 m 、 n 、 X^p 、 X^q は任意の自然数を表す。)



(式中、基本骨格および側鎖 R^{m+1} の基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、 Z は炭素原子もしくは窒素原子を表し、 R' は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する 2 つの R' は同一であっても異なってもよい。また、式中、 a 、 b 、 c 、 X^{p+1} 、 X^{q+1} は任意の自然数を表す。)

(4) 基本骨格に次式 (IV) の繰り返し構造を含む、(1) から (3) のいずれかに記載の組成物、



(5) テトラエチレンペンタミンが 2 分子ないし 5 分子、直鎖状に連

結した(4)に記載の組成物、

(6) R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、(5)に記載の組成物、

(7) R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、(5)に記載の組成物、

(8) 式(IV)を含む構造が分岐状に連結した(4)に記載の組成物、

(9) R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、(8)に記載の組成物、

(10) R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、(8)に記載の組成物、

(11) 基本骨格にスベルミン構造を含む、(1)から(3)のいずれかに記載の組成物、

(12) スベルミンが2分子ないし5分子、直鎖状に連結した(11)に記載の組成物、

(13) R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、(11)に記載の組成物、

(14) R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、(11)に記載の組成物、

(15) スベルミン構造が分岐状に連結した(11)に記載の組成物、

(16) R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、(14)に記載の組成物、

(17) R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、(14)に記載の組成物、

(18) さらにリン脂質を含む、(1)から(17)のいずれかに記載

の組成物、

(19) リン脂質が、中性リン脂質または酸性リン脂質である、(18)に記載の組成物、

(20) リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン骨格またはホスファチジルコリン骨格を有する、(19)に記載の組成物、

(21) リン脂質が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンである、(20)に記載の組成物、

(22) 負電荷を有する生理活性物質と、(1)から(21)のいずれかに記載の組成物を含む複合体、

(23) 負電荷を有する生理活性物質が、核酸またはその誘導体である、(22)に記載の組成物を含む複合体、

(24) (22)または(23)に記載の複合体を細胞に接触させる工程を含む、負電荷を有する生理活性物質を細胞内へ導入する方法、

(25) (19)から(21)のいずれかに記載の組成物を製造するための、リン脂質および疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含むキット、に関する。

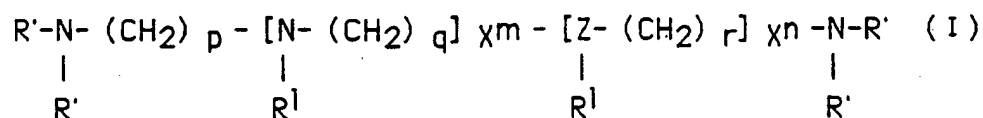
本発明は、疎水性基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含む組成物に関する。本発明において「ポリアルキレンイミン」とは、プロトン化したアミノ基を有するポリマー分子を指し、直鎖型であっても分岐型であってもよい。ポリアルキレンイミンの構成単位であるアルキレンモノマーは、炭素数が1～10の低級アルキレンイミンであることが好ましく、水に対する溶解性の観点から炭素数が1～3の低級アルキレンイミンであることがさらに好ましい。合成の容易性の観点からは、特にポリエチレンイミンまたはスベルミンであることが好ましい。ポリエチレンイミンは、当業者に公知の方法により製造することができる（例えば、特公昭 49-331230 号公報、特公昭 43-

8828 号公報、米国特許第 4,032,480 号明細書、および米国特許第 4,467,115 号参照)。また、市販品 (例えば、ポリエチレンイミン (分子量 600, 商品名エボミン (株式会社日本触媒製)、商品名 ExGen 500 (Euromedex 社製)、テトラエチレンペンタミン等) を用いてもよい。本発明において用いられるポリエチレンイミンの平均分子量は、通常、200 から 1,000,000 であり、好ましくは 300 から 500,000 であり、さらに好ましくは 500 から 100,000 である。また、スベルミンは市販品を用いることができる。

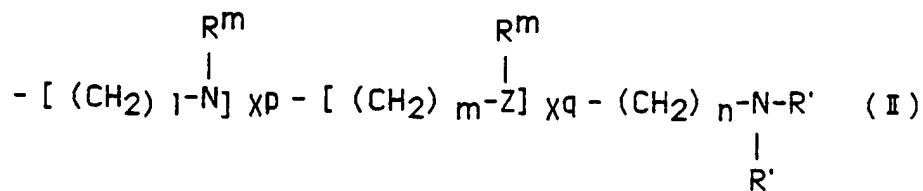
ポリアルキレンイミンに導入する疎水性基としては、ポリアルキレンイミンとリン脂質との親和性を高めるものであれば特に制限はなく、例えば、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、または飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、またはリン脂質残基が挙げられる。好ましくは、オクチル基、セチル基、ステアリル基、オレイル基である。ポリアルキレンイミンには、負電荷物質の細胞内への導入効率を高めるために一分子中に少なくとも 2 つの疎水性基が導入される。但し、疎水性基の導入数を過剰に増加させると、ポリアルキレンイミンの水に対する溶解性が低下してしまうため好ましくない。分子内における好適な疎水性基の数は、当業者であれば、適宜選択することが可能である。ポリアルキレンイミンに導入される疎水性基は、スペーサーを介してポリアルキレンイミンに結合していてもよい。スペーサーとしては、中性の水溶性分子が好ましく、例えば、アミノ酸、ペプチド、ポリアミノ酸、タンパク質、糖、さらにポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、デキストラン誘導体等の合成高分子およびそれらの誘導体を用いることができる。負電荷物質を輸送するための担体として用いる場合、ポリアルキレンイミンは塩を形成していてもよい。ポリアルキレンイミンの塩

としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、炭酸塩、ギ酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩等が挙げられるが、これらに制限されない。

本発明のポリアルキレンイミンの好ましい態様を、下記構造式 (I) に示す。

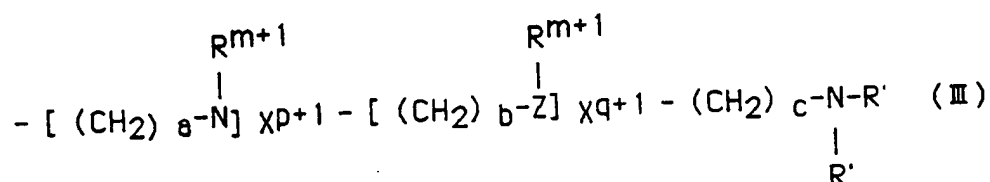


(式中、基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、Zは炭素原子もしくは窒素原子を表し、R'は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つのR'は同一であっても異なってもよく、側鎖R'¹は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式 (II) を表す。また、式中、p、q、r、Xⁿ、X^mは任意の自然数を表す。)



(式中、基本骨格および側鎖R^mにアミド結合が含まれていてもよく、Zは炭素原子もしくは窒素原子を表し、R'は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽

和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つの R' は同一であっても異なってもよく、 R^m は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式(III)を表す。また、式中、 l 、 m 、 n 、 X^p 、 X^q は任意の自然数を表す。



(式中、基本骨格および側鎖 R^{m+1} の基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、 Z は炭素原子もしくは窒素原子を表し、 R' は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つの R' は同一であっても異なってもよい。また、式中、 a 、 b 、 c 、 X^{p+1} 、 X^{q+1} は任意の自然数を表す。)

該ポリアルキレンイミンは、基本骨格に次式(IV)の繰り返し構造を含むことができ、



好ましくは、テトラエチレンペンタミンが2分子ないし5分子、直鎖状に連結している。

より好ましくは、 R' 、 R^l 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、

トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含み、さらに好ましくは、 R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む。

該ポリアルキレンイミンにおいて、式(IV)を含む構造は、分岐状に連結していてもよい。

また、本発明のポリアルキレンイミンは、基本骨格にスベルミン構造を含んでいてもよい。好ましくは、スベルミンが2分子ないし5分子、直鎖状に連結している。スベルミン構造は、分岐状に連結していてもよい。

これにより調製された複数の疎水性基が導入されたポリアルキレンイミンは、単独で負電荷物質を輸送するための担体として用いることも可能であるが、さらに、リン脂質と混合することにより、リボソームを形成させて担体として用いることも可能である。疎水基はリン脂質内部に安定化する性質を有するため、疎水基が導入されたポリアルキレンイミンはリボソームにおいて安定的に存在しうると考えられる。リボソームの形成に用いられるリン脂質としては、それ自体で、負電荷を有する生理活性物質と相互作用をしない中性または酸性の脂質であることが好ましい。リン脂質は、天然由来であっても、合成されたものであってもよい。本発明に用いられるリン脂質のアルキル側鎖としては、炭素数12~18のものまたはオレイル基が好ましい。リン脂質としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミン骨格を有するジオレオイルホスファチジ

ルエタノールアミンやホスファチジルコリン骨格を有するホスファチジルコリン（例えば、卵黄由来、大豆由来あるいは合成のもの）が好適に用いられる。リン脂質とポリエチレンジイミンの混合比は、混合物が負電荷物質と電氣的親和性を有する程度に正に帯電する範囲であれば、特に制限はない。好ましい混合比は当業者であれば、適宜選択することができる。

また、本発明は負電荷を有する生理活性物質と上記組成物とを含む複合体に関する。負電荷を有する生理活性物質としては、多価の負電荷を有する生理活性物質であれば特に制限はない。多価の負電荷を有する生理活性物質としては、例えば、核酸およびその誘導体が挙げられる。核酸としては、環状および直鎖状の1本鎖もしくは2本鎖のデオキシリボ核酸であっても、リボ核酸であってもよい。核酸の誘導体としては、例えば、ホスフォロチオエート、ホスフォロジチオエート等が例示される。本発明の複合体において、負電荷を有する生理活性物質に対する上記組成物の混合比は、電荷比で1/100当量から20当量であることが好ましい。好適な混合比は、当業者であれば適宜選択することができる。複合体の粒形は、200 nm以下であることが好ましく、100 nm以下であることがさらに好ましい。本発明の複合体の製造において、他の補助剤は特に必要ないが、補助剤としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリン、脂肪酸など両親媒性の分子等を用いることも可能である。

負電荷物質の輸送において本発明のポリアルキレンジイミンを単独で用いる場合には、負電荷物質と直接混合して複合体を形成させた後、公知の方法（O. Boussif et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7297-7301(1995)）に従って負電荷物質を細胞内へ導入することができる。一方、本発明のポリアルキレンジイミンをリン脂質と混合してリボソームを

形成させる場合には、まず、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE、日本精化株式会社製) またはホスファチジルコリン (eggPC、日本精化株式会社製) などのリン脂質と本発明のポリアルキレンイミンを混合し、これを公知の方法 (N. Oku et al., Biochim. Biophys. Acta. 1280, 149-154, (1996))) に従いリボソームの水分散液を調製する。この際、リボソームは膜安定化剤としてコレステロール等のステロール類を、抗酸化剤としてトコフェロール、ビタミン E などを含んでもよい。リポドマイクロスフェアの場合、本発明のポリアルキレンイミンと大豆油と界面活性剤とを加えて公知の方法 (F. Liu et al., Pharmaceutical Res. 13, 1642-1646 (1996))) により目的のリポドマイクロスフェアを得ることができる。これを負電荷物質と混合した後、細胞に接触させることにより、負電荷物質を細胞内へ導入することができる。

また、本発明はリボソームを調製するための、リン脂質および疎水性基が一分子中に 2 個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含むキットに関する。本発明のキットにはリン脂質および疎水性基が一分子中に 2 個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩の他に、さらに、上記の膜安定化剤、抗酸化剤を含んでもよい。本発明のキットに含まれるリン脂質標品及びポリアルキレンイミン標品の最終形態としては、冷蔵、冷凍または凍結乾燥品とすることが可能である。凍結乾燥品の場合は安定化剤としてソルビトール、シュクロース、アミノ酸及び各種タンパク質等を含んでもよい。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例において用いた疎水基を導入したポリエチレンイミンの構造を示す図である。

図 2 は、本発明の組成物と従来のリボソームを用いた場合のプラスミ

ドトリボソームとの荷電比を変えた時の GFP 遺伝子発現を表わす図である。図中、PCL はトリセチル-PEI:DOPE (0.65:1,モル比, ポリエチレンイミン分子量: 600) を示す。同様に DMRIE:DOPE(1:1,モル比)、DOTAP:DOPE(1:1,モル比) を示し、細胞は COS-1 を用いた。また、プロット上の棒線は±SD を示す。

図 3 は、リン脂質の遺伝子発現に及ぼす影響を表わす図である。図中、DOPE-PCL はトリセチル-PEI: DOPE (0.65:1,モル比) を示す。eggPC-PCL はトリセチル-PEI: eggPC (0.65:1,モル比) を示す。

図 4 は、本発明のリボソーム単独またはプラスミド複合体濃度を変えた時の細胞毒性を表わす図である。図中、PCL はトリセチル-PEI:DOPE (0.65:1,モル比、PEI 分子量 600) を示す。細胞は COS-1 を用いた。また、棒グラフ上部の棒線は±SD の+側を示す。

図 5 は、従来のリボソーム (DMRIE)の単独またはプラスミド複合体の濃度を変えた時の細胞毒性を表わす図である。図中、DMRIE lipo. は DMRIE:DOPE(1:1,モル比) を示す。細胞は COS-1 を用いた。また、棒グラフ上部の棒線は±SD の+側を示す。

図 6 は、従来のリボソーム (DOTAP)の単独またはプラスミド複合体の濃度を変えた時の細胞毒性を表わす図である。図中、DOTAP lipo. は DOTAP:DOPE(1:1,モル比) を示す。細胞は COS-1 を用いた。また、棒グラフ上部の棒線は±SD の+側を示す。

図 7 は、分子量 600 のポリエチレンイミンを出発原料としたアルキル化分岐型ポリエチレンイミンの構造を示す。

図 8 は、分子量 1,800 のポリエチレンイミンを出発原料としたアルキル化分岐型ポリエチレンイミンの構造を示す。

図 9 は、アルキル化直鎖型エチレンイミンの合成ルート (1) を示す図である。

図 10 は、アルキル化直鎖型エチレンイミンの合成ルート (2) を示す図である。

図 11 は、アルキル化直鎖型エチレンイミンの構造を示す図である。

図 12 は、アルキル化直鎖型スベルミンの合成ルート (1) を示す図である。

図 13 は、アルキル化直鎖型スベルミンの合成ルート (2) を示す図である。

図 14 は、アルキル化直鎖型スベルミンの合成ルート (3) を示す図である。

図 15 は、アルキル化直鎖型スベルミンの合成ルート (4) を示す図である。

図 16 は、アルキル化直鎖型スベルミンの構造を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] ポリエチレンイミンの精製

市販のポリエチレンイミン (分子量 600, 商品名エボミン SP-006、株式会社日本触媒製) 2 g を 100ml の蒸留水で溶解し、分画分子量 500 の限外濾過膜 (UH-05, 東洋濾紙製; 限外濾過装置 はアミコン社製、攪拌式セル 8,400 型) で、 $2\text{--}3\text{kg/cm}^2$ の窒素気流下、1000ml の蒸留水で限外濾過を行った。不純物を除いた限外濾過処理液 (約 20-30ml) を凍結乾燥して精製ポリエチレンイミンを得た。

[実施例 2] セチル化ポリエチレンイミンの合成

20ml のクロロホルム中、1g の精製ポリエチレンジイミン(分子量 600)と 1.62g のセチル ブロマイドを混合し(モル比、1:2)、1ml のトリエチルアミンを添加して還流させた。次いで、分画分子量 1000 の限外濾過膜(YM1、アミコン社製)を用い未反応のポリエチレンジイミンを除去した。凍結乾燥したセチル化ポリエチレンジイミンの収率は 70.4%であった。セチル化ポリエチレンジイミンのセチル基の導入数は NMR で検討した。即ち、1.3ppm 付近のセチル基と 2.5-3.5ppm 付近のポリエチレンジイミンのプロトン比は 1 分子のポリエチレンジイミンにセチル基 3 分子が結合していることを支持した。合成したポリエチレンジイミンを図 1 に示す。

【実施例 3】 リボソームの調製

リボソームを調製するために、予め 10mM セチル化ポリエチレンジイミンのクロロホルム 溶液と 10mM ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE、日本精化株式会社製)の クロロホルム溶液を調製した。用いた脂質組成はセチル化ポリエチレンジイミン/DOPE=0.65/1(モル比)とした。この脂質をナス型フラスコに取りクロロホルムに溶解した後、ロータリーエバポレーターでクロロホルムを減圧留去し脂質フィルムを作製した。この脂質フィルムを高真空下で 1 時間乾燥した後、1mM 溶液となるように DMEM(ギブコ BRL 社製)で水和した。その後、凍結融解を 3 回繰り返し、リボソームをバス型ソニケーターで 10 分間超音波処理した。リボソームは安定ではあるが用時調製した。

また、比較例として、セチル化ポリエチレンジイミンの代わりに 1、2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DMRIE)または 1、2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)を用いて上記と同様にリボソームを得た。

【実施例 4】 プラスミド DNA/リボソーム 複合体の作製

プラスミド DNA は pEGFP-C1 (クローンテック社製) を用いた。このプラスミドは、レポータ遺伝子として GFP (green fluorescent protein) をコードしているため、その遺伝子発現は GFP の蛍光強度を測定することで定量できる。プラスミドを大腸菌で調製、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製し、TE 緩衝液 (pH 7.5) に $2\mu\text{g/ml}$ の濃度で溶解した。プラスミド DNA 量を一定にし、1.5ml エッペンドルフチューブにとり、各比率の 1mM リボソーム溶液を添加し、100 μl となるよう DMEM を加え、室温で 20 分間インキュベーションした。

【実施例 5】 遺伝子導入

COS-1 細胞を 1×10^5 cells/ディッシュで 35mm ディッシュに播き、37°C、5%CO₂ 存在下で一夜培養した。DMEM で 2 回洗浄した後、調製したリボソーム/プラスミド DNA 複合体を血清無添加の DMEM で希釈し、全液量 250 μl となるように調製し細胞に添加した。添加後、37°C、5%CO₂ の条件下で 3 時間インキュベーションした。3 時間後、リボソーム/プラスミド DNA 複合体溶液を除去し、血清無添加の DMEM で 2 回洗浄後、10%FBS-DMEM 2ml を加えて 48 時間培養した。

【実施例 6】 導入遺伝子発現 (GFP) の定量

上記の 48 時間培養した細胞の培養液を除き血清無添加の DMEM で 2 回洗浄後、最終濃度 1% の濃度で TritonX100 溶液を添加後、室温で 30 分インキュベーションして可溶化した。細胞溶液を懸濁してエッペンドルフチューブに移し 3000rpm で 10 分間遠心した。遺伝子発現量は Ex 493nm、Em 510nm の蛍光強度測定によった。この結果を図 2 に示す。本発明の組成物を用いた場合は対照の DMRIE、DOTAP に比べて遺伝子発現は 2 倍以

上高かった。

〔実施例 7〕 比較リボソームを用いた場合の導入遺伝子発現

実施例 3 で DOPE の代わりに卵黄由来のホスファチジルコリン(eggPC)を用いた以外は実施例 1 ～ 6 と同様にして導入遺伝子発現の定量を行った。図 3 に結果を示した。図 3 からわかるように、eggPC を用いた場合、DOPE に近似した遺伝子発現を示した。

〔実施例 8〕 細胞毒性の検討

COS-1 細胞を 24 ウェルプレート(コーニング社製)に 1 ウェルあたり 1ml ずつ添加し、37℃、5%CO₂ 存在下で一晩培養しコンフルエントとした。DMEM でウェルを 2 回洗浄後、調製したプラスミド DNA/リボソーム複合体溶液を様々な濃度で 1 ウェルあたり 200 μl ずつ添加した。添加後、37℃、5%CO₂ 存在下で 3 時間インキュベーションした。また、対照として DMEM のみ、リボソーム溶液のみについても同様に行った。

〔実施例 9〕 細胞密度の測定

細胞毒性についてはアラマーブルー (alamerBlue、Biosource International 社、輸入元は岩城硝子株式会社) を用いて行った。まず、それぞれのサンプル溶液を除去し、各ウェルあたり血清無添加の DMEM 200 μl および 5 倍希釈したアラマーブルー溶液を 50 μl ずつ添加した。添加後、37℃、5%CO₂ 存在下で 1 時間インキュベーションした。1 時間後、各ウェルの溶液を 1.5ml エッペンドルフチューブにとり、750 μl の PBS(-)を加えて 1ml し、Ex 535nm、Em 583nm の蛍光強度測定を行った。その結果を図 4、図 5、図 6 に示す。本発明の組成物を用いた場合には、従来のリボソームを用いた場合に比べて特に高濃度の複合体溶液におい

て著しく細胞毒性が低下していた。

[実施例 10] アルキル化分岐ポリエチレンイミン誘導体の合成

アルキル基鎖長の遺伝子導入能に及ぼす効果を調べるため、実施例 1 および 2 と同様な方法を用いて、分子量 600 のポリエチレンイミン（以下、PEI (6)、化合物 1、化合物名 P6）にアルキル基を新たに導入した（図 7、図 8）。

化合物 2 の合成

化合物名 P6D20.3（アルキル化度 20.3%）の合成：

ポリエチレンイミン、PEI (6) 5.0g をエタノール 20ml に溶解し、デシルブロマイド 3.69g (3.45ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてデシルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 42.2%； $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.85 (9H, t, CH_3 -), 1.30 (36H, m, decyl の CH_2), 2.70 (54H, br, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$), 3.20 (14H, m, $-\text{NH}-$) δ : 0.85 と 2.70 のプロトン比からデシル基が 20.3% 導入されていることを確認した。

化合物 3 の合成

化合物名, P6L18.4（アルキル化度 18.4%）の合成：

PEI (6) 2.0g をエタノール 10ml に溶解し、ラウリルブロマイド 1.66g (1.60ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてデシルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により

精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 68.4% ;
 $^1\text{H NMR (D}_2\text{O)}$ δ : 0.80 (8H, t, CH_3 -), 1.20 (46H, m, lauryl の CH_2), 2.60 (54H, br, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$) δ : 0.80 と 2.60 のプロトン比からラウリル基が 18.4% 導入されていることを確認した。

化合物 4 の合成

化合物名, P6M18.8 (アルキル化度 18.8%) の合成:

PEI (6) 5.0g をエタノール 20ml に溶解し、ミリスチルブロマイド 4.63g (4.97ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてミリスチルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 54.8%: $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$ δ : 0.90 (8H, t, CH_3 -), 1.30 (55H, m, myristyl の CH_2), 2.70 (55H, br, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$), 3.55 (20H, m, $-\text{NH}-$) δ : 0.90 と 2.70 のプロトン比からミリスチル基が 18.8% 導入されていることを確認した。

化合物 5 の合成

化合物名, P6C17.5 (アルキル化度 17.5%) の合成:

PEI (6) 1.28g をエタノール 10ml に溶解し、セチルブロマイド 1.30g (1.30ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてセチルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 82.6% ; $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$ δ : 0.88 (8H, t, CH_3 -), 1.25 (60H, m, cetyl の CH_2), 2.70 (44H, br, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$), 3.90 (8H, m, $-\text{NH}-$) δ : 0.88 と 2.70 の

プロトン比からセチル基が 17.5% 導入されていることを確認した。

化合物 6 の合成

化合物名, P6C24.5 (アルキル化度 24.5%) の合成:

PEI(6)1.0g をエタノール 10ml に溶解し、セチルブロマイド 1.02g (1.02ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてセチルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 85.5%; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 0.88 (10H, t, CH_3 -), 1.25 (75H, m, cetyl の CH_2), 2.65 (45H, br, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$), 4.88 (22H, m, $-\text{NH}-$) δ : 0.88 と 2.65 のプロトン比からセチル基が 24.5% 導入されていることを確認した。

化合物 7 の合成

化合物名, P6S21.1 (アルキル化度 21.1%) の合成:

PEI(6)5.0g をエタノール 20ml に溶解し、ステアリルブロマイド 5.57g (5.71ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてステアリルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 86.0%; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 0.90 (9H, t, CH_3 -), 1.30 (74H, m, stearyl の CH_2), 2.70 (57H, br, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$), 3.70 (17H, m, $-\text{NH}-$) δ : 0.90 と 2.70 のプロトン比からステアリル基が 21.1% 導入されていることを確認した。

化合物 8 の合成

化合物名, P6S11.3 (アルキル化度 11.3%) の合成:

PEI (6) 5.0g をエタノール 20ml に溶解し、ステアリルブロマイド 2.78g (2.85ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてステアリルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 53.3%; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 0.90 (5H, t, CH_3 -), 1.25 (35H, m, stearyl の CH_2), 2.60 (56H, br, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$), δ : 0.90 と 2.60 のプロトン比からステアリル基が 11.3% 導入されていることを確認した。

同様に、分子量 1,800 (商品名エボミン SP-018、株式会社日本触媒) ポリエチレンイミン (PEI (18) と略称) にセチル (cetyl, C=16) 基を導入し、導入率の異なる 2 種の化合物を合成した。

化合物 9 の合成

化合物名, P18C12.3 (アルキル化度 12.3%) の合成

PEI (6) 1.50g をエタノール 10ml に溶解し、セチルブロマイド 0.87g (0.87ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてセチルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 84.0%; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 0.88 (15H, t, CH_3 -), 1.25 (117H, m, cetyl の CH_2), 2.70 (170H, br, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$), 3.70 (23H, m, $-\text{NH}-$) δ : 0.88 と 2.70 のプロトン比からセチル基が 12.3% 導入されていることを確認した。

化合物 10 の合成

化合物名, P18C20.6 (アルキル化度 20.6%) の合成

PEI (6)1.0g をエタノール 10ml に溶解し、セチルブロマイド 1.19g (1.19ml) をゆっくりと添加した。窒素フロー、攪拌をしながら 75°C で反応させ、8 時間後、TLC にてセチルブロマイドの消失を確認して合成を終了した。次に、蒸留水を 150ml 加え、限外ろ過 (amicon YM1) により精製、フリーズドライにより水を除去してポリマーを得た。収率 92.8%; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 0.88 (26H, t, CH_3 -), 1.25 (207H, m, cetyl の CH_2), 2.70 (155H, br, $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}-$), 5.15 (44H, m, $-\text{NH}-$) δ : 0.88 と 2.70 のプロトン比からセチル基が 20.6% 導入されていることを確認した。

[実施例 11] ストック溶液の調製

実施例 10 で合成した 9 種の誘導体を各々滅菌蒸留水に溶解し、pH を 7 付近に調製した。水で溶解し難い化合物は 50°C で 15-30 分加熱、pH 調製後、プローブ型超音波 (BRONSON 社、20 Duty cycle、5 分) で処理した。全てのキャリアー溶液は最後にフィルター (DISMIC-25cs、Cellulose acetate, 0.2 μm , ADVANTEC TOYO) で濾過した。

キャリアー溶液の濃度はアミンニトロゲンのモル濃度とした。即ち、分子量 600 のポリエチレンジイミンの濃度はモノマーの分子量を 43 とし、43mg/ml を 100mM (100nmol/ μl) の陽電荷モル数とした。一方、アルキル化ポリエチレンジイミン溶液の濃度は導入したアルキル基の分子量と導入数を補正して算出した。これらのアルキル化ポリエチレンジイミンのストック溶液は使用時まで 4°C で保存した。

[実施例 12] プラスミド溶液の調製法

β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子 (pCMVbeta(Clontech 社) に由来する) をプラスミド pCAGGS (Hum Gene Ther. 1998; 9:1701-7) に挿入し、プラスミド pCAG-LZ15 を構築した。このプラスミドのストック溶液

(5mg DNA/ml TE)を細胞培養用培地の D-MEM (GIBCOBRL 社製)で希釈し 58 μ g DNA/ml の DNA 溶液を調製した。1 μ g DNA の負電荷モル数は 3nmol、58 μ g DNA の負電荷モル数は 58 μ g x 3n mol=174 nmol とした。

[実施例 13] 各種誘導体キャリアー溶液の調製法

N/P (N: キャリアーのニトロゲンの陽電荷モル数/P: DNA のリン酸を負電荷モル数の比) が 18 等量となるよう実施例 11 のストック溶液を D-MEM で調製した。

[実施例 14] DNA 複合体の形成法

1.5ml エッペンドルフチューブに実施例 12 の DNA 溶液 100 μ l を入れ、次いで実施例 13 のキャリアー溶液 100 μ l を加えて軽くボルテックスで混合後、室温で 30 分以上放置し、DNA 複合体 (N/P=18 等量) を形成させた。この操作は遺伝子導入 (DNA のトランスフェクション) の直前に行った。

[実施例 15] ヒト肝癌細胞への in vitro 遺伝子導入

DNA の遺伝子導入 18 時間前にヒト肝癌細胞の Hep G2 を 24-ウェルディッシュに 30,000 細胞数/ウェルとなるようシードした。遺伝子導入直前に細胞を MEM で 2 回洗浄した。実施例 6 の DNA と複合体溶液を 290ngDNA/200 μ l/ウェルとなるよう MEM および血清添加 (50%FBS) MEM で希釈しこの遺伝子導入溶液を細胞 200 μ l/ウェルとなるよう加えた。5%炭酸ガス培養器で 37°C で 3 時間培養後、遺伝子導入溶液を除き、血清 (10%FBS) を含む MEM 培地で 2 回洗浄、次いで同培地を 1ml/ウェルとなるよう加えて 5%炭酸ガス培養器で 37°C で 48 時間培養した。対照の LipofectAMINE (GIBCOBRL, 2mg/ml) は DNA : LipofectAMINE=290 μ g : 1 μ

g の比率で OPTI-MEM 培地(GIBCOBRL)で DNA 複合体を形成させ同量の DNA を用いた。

[実施例 16] Lac Z 活性の測定

実施例 14 の細胞の培地を除き、D-PBS(-)(日研生物医学研究所)で 2 回洗浄、培養細胞溶解試薬、LC β (商品名:ピッカジーン、和光純薬販売)を 100 μ l/ウェルとなるよう加え、室温で 15 分放置、小型のプロープ型超音波装置 (UR-20P、トミー精工社製、Power 10)で 5 秒間処理して細胞を破壊した。この細胞溶解液をウェルから 0.5ml エッペンドルフチューブに移し、遠心 (1,200rpm、3 分、室温)した上清を LacZ 活性の測定に供した。

LacZ 活性の測定は TROPIX, Inc 社のプロトコールに従った。各々の遺伝子導入実験はトリプリケート (triplicate)で行い LacZ 活性は細胞蛋白(mg)/測定時間(1 秒間)当たりの平均 light unit \pm SD で表示した。細胞蛋白は BCA 法 (Pierce 社)によった。

[実施例 17] アルキル化分岐ポリエチレンジイミン誘導体の in vitro 遺伝子発現

アルキル化分岐型ポリエチレンジイミン-DNA 複合体の HepG2 細胞に対する LacZ 遺伝子の発現を比較して表 1 に示した。数値は平均値 \pm SD (n=3)を示す。分子量 600 のポリエチレンジイミンにアルキル基を導入することで遺伝子発現は増強した。また、セチル基 (C=16)を導入した P6C24.5、P6C17.5 と DNA の DNA 複合体の遺伝子発現は最も高く、LipofectAMINE に比べ血清非存在下で遺伝子導入した時は約 4 倍、50%血清存在下で形質転換した時は 10 倍以上高い値を示した。

セチル誘導体につきポリエチレンジイミンの分子量を比較したが分子量

600 が 1,800 より高い値を示した。

表 1

化合物	化合物 番号	遺伝子発現 LacZ (RLU/ μ g \cdot sec)	
		No serum	50% Serum
P6	1	998 \pm 277	675 \pm 405
P6D20.3	2	87,740 \pm 15,127	485 \pm 216
P6L18.4	3	343,267 \pm 3,449	25,178 \pm 5,649
P6M18.8	4	193,790 \pm 24,371	307 \pm 135
P6C17.5	5	453,539 \pm 7,415	446,556 \pm 50,168
P6C24.5	6	458,970 \pm 24,796	467,869 \pm 8,685
P6S21.1	7	282,858 \pm 29,015	168,580 \pm 18,461
P6S11.3	8	196,244 \pm 17,181	119,383 \pm 19034
P18C12.3	9	217,607 \pm 7,083	80,766 \pm 7,426
P18C20.6	10	34,336 \pm 6,861	28,585 \pm 4,520
LipofectAMINE		113,637 \pm 48,504	34,847 \pm 5,483

[実施例 18] リボソームとの 遺伝子発現比較

P6C24.5 と DNA との複合体の遺伝子発現をリボソームと DNA の複合体 (PCL) と比較した。リボソーム組成は P6C24.5/DOPE (1:1, モル比) とし調製法は実施例 3 に準じた。DNA 複合体の調製法は実施例 12-14 に準じた。細胞は正常ウシ脳血管内皮細胞 (BBMC、セルシステムズ社、大日本製薬株式会社販売) を用い、実施例 15 と同様の方法で遺伝子導入を行った。

結果を表 2 に示す。表中、PCL は P6C24.5/DOPE (1:1, モル比) を示し、数値は平均値 \pm SD (n=3) を示す。PCL と DNA 複合体の遺伝子発現は、血

血清存在下で遺伝子導入した時、P6C24.5 単独とほぼ同等、LipofectAMINE の約 10 倍高い値であった。一方、血清存在下で遺伝子導入すると、PCL と DNA 複合体の遺伝子発現は、P6C24.5 単独の 10 倍以上、LipofectAMINE の約 200 倍高い値であった。

表 2

	電荷比 (eq)	遺伝子発現 LacZ (RLU/ μ g \cdot sec)	
		No serum	50% Serum
P6C24.5	18eq	214,053 \pm 72,524	5,634 \pm 1,381
PCL	9eq	192,369 \pm 24,775	78,051 \pm 5,891
LipofectAMINE		20,628 \pm 11,680	41 \pm 3

[実施例 19] アルキル化直鎖エチレンジミンの合成

図 9-10 に示した合成ルートに従い、図 11 に示した 3 種のアルキル化直鎖型エチレンジミンを合成した。以下に合成法を示す。

化合物 12 の合成 (図 9)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.462 g、11.6 mmol) をジメチルホルムアミド (160 ml) に懸濁させ、氷冷下にてテトラエチレンペンタミンペンタトシレート (化合物 11、10.1 g、10.5 mmol) のジメチルホルムアミド (40 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下 3-[(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ]-1-ブロモプロパン (2.92 g、11.5 mmol) を滴下した。反応液を室温で 20 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (500 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (2:1) で溶出された分画を集め

て、化合物 2 (3.57 g) を白色の粉末として得た。収率 30% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.024 (6H, s), 0.88 (9H, s), 1.65-1.78 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.44 (3H, s), 2.45 (3H, s), 3.10-3.45 (18H, m), 3.58 (2H, t, $J=6.0$ Hz), 5.39 (1H, t, $J=5.9$ Hz), 7.23-7.38 (10H, m), 7.65-7.83 (10H, m). FAB MS m/z : 1132 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 13 の合成 (図 9)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.0644 g、1.61 mmol) をジメチルホルムアミド (24 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 12 (1.52 g、1.34 mmol) のジメチルホルムアミド (6 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下 1-ブロモヘキサデカン (491 μl 、1.61 mmol) を滴下した。反応液を室温で 6 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (35 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (3:1) で溶出された分画を集めて、化合物 13 (1.64 g) を白色の粉末として得た。収率 90% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.023 (6H, s), 0.80-0.95 (3H, m), 0.88 (9H, s), 1.10-1.35 (26H, m), 1.42-1.55 (2H, m), 1.64-1.80 (2H, m), 2.40 (6H, s), 2.42 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.03-3.11 (2H, m), 3.16-3.23 (2H, m), 3.25-3.45 (16H, m), 3.58 (2H, t, $J=5.9$ Hz), 7.25-7.36 (10H, m), 7.71-7.86 (10H, m). FAB MS m/z : 1356 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 14 の合成 (図 9)

化合物 12 (1.47 g、1.30 mmol) および 1-ブロモドデカン (373 μl 、1.56 mmol) から、化合物 13 の合成と同様に操作し、化合物 14 (1.48 g) を白色の粉末として得た。収率 88% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.023 (6H,

s), 0.80-0.95 (3H, m), 0.88 (9H, s), 1.10-1.35 (18H, m), 1.41-1.58 (2H, m), 1.65-1.80 (2H, m), 2.40 (6H, s), 2.41 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.03-3.11 (2H, m), 3.16-3.23 (2H, m), 3.25-3.45 (16H, m), 3.58 (2H, t, $J=5.9$ Hz), 7.25-7.36 (10H, m), 7.71-7.81 (10H, m). FAB MS m/z : 1300 $[M+H]^+$.

化合物 15 の合成 (図 9)

化合物 12 (0.803 g、0.709 mmol) および 1-ブロモオクタン (147μ l、0.851 mmol) から、化合物 13 の合成と同様に操作し、化合物 15 (0.730 g) を白色の粉末として得た。収率 83% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.023 (6H, s), 0.87 (3H, t, $J=6.6$ Hz), 0.88 (9H, s), 1.10-1.35 (10H, m), 1.45-1.57 (2H, m), 1.66-1.77 (2H, m), 2.40 (6H, s), 2.42 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.03-3.12 (2H, m), 3.15-3.24 (2H, m), 3.23-3.45 (16H, m), 3.58 (2H, t, $J=5.9$ Hz), 7.26-7.35 (10H, m), 7.70-7.81 (10H, m). FAB MS m/z : 1244 $[M+H]^+$.

化合物 16 の合成 (図 9)

化合物 13 (1.63 g、1.20 mmol) のテトラヒドロフラン (33 ml) 溶液に、テトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン (1M) 溶液 (1.44 ml、1.44 mmol) を氷冷下にて滴下した。室温で 1.5 時間攪拌した後、反応液を水で希釈し、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を水洗・乾燥・濃縮し、得られた残渣をシリカゲル (30 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。ヘキサン-酢酸エチル (1:1) で溶出された分画を集めて、表記の化合物 (1.30 g) を白色の粉末として得た。収率 87% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz), 1.15-1.34 (26H, m), 1.45-1.55 (2H, m), 1.74-1.84 (2H, m), 2.26 (1H, t, $J=6.2$ Hz, -OH),

2.405 (3H, s), 2.415 (3H, s), 2.422 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.02-3.10 (2H, m), 3.22 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 3.25-3.46 (16H, m), 3.66-3.76 (2H, m), 7.26-7.35 (10H, m), 7.70-7.80 (10H, m). FAB MS m/z : 1242 $[M+H]^+$.

化合物 17 の合成 (図 9)

化合物 14 (1.47 g、1.13 mmol) およびテトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン (1M) 溶液 (1.36 ml、1.36 mmol) から出発し、化合物 16 の合成と同様に操作し、化合物 17 (1.21 g) を白色の粉末として得た。収率 91% ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz), 1.16-1.35 (18H, m), 1.44-1.56 (2H, m), 1.74-1.85 (2H, m), 2.27 (1H, t, $J=6.0$ Hz, -OH), 2.405 (3H, s), 2.415 (3H, s), 2.423 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.02-3.12 (2H, m), 3.22 (2H, t, $J=6.8$ Hz), 3.25-3.45 (16H, m), 3.66-3.74 (2H, m), 7.26-7.35 (10H, m), 7.70-7.80 (10H, m). FAB MS m/z : 1186 $[M+H]^+$.

化合物 18 の合成 (図 9)

化合物 15 (0.590 g、0.474 mmol) およびテトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン (1M) 溶液 (0.57 ml、0.57 mmol) から出発し、化合物 16 の合成と同様に操作し、化合物 18 (0.513 g) を白色の粉末として得た。収率 96% ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.87 (3H, t, $J=7.0$ Hz), 1.15-1.35 (10H, m), 1.44-1.56 (2H, m), 1.75-1.85 (2H, m), 2.26 (1H, t, $J=6.2$ Hz, -OH), 2.41 (3H, s), 2.415 (3H, s), 2.423 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.02-3.12 (2H, m), 3.22 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 3.26-3.44 (16H, m), 3.66-3.75 (2H, m), 7.27-7.35 (10H, m), 7.70-7.80 (10H, m). FAB MS m/z : 1130 $[M+H]^+$.

化合物 19 の合成 (図 9)

化合物 16 (1.30 g、1.05 mmol) と四臭化炭素 (1.25 g、3.77 mmol) のメチレンクロリド (26 ml) 溶液に、トリフェニルホスフィン (0.988 g、3.77 mmol) を氷冷下で加えた。氷冷下で 20 分間、更に室温で 1 時間攪拌した後、反応液を減圧下で乾固した。得られた残渣をシリカゲル (60 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。ヘキサン-酢酸エチル (3:1) で溶出された分画を集めて、表記の化合物 (1.34 g) を白色の粉末として得た。収率 98% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz), 1.15-1.35 (26H, m), 1.43-1.55 (2H, m), 2.07-2.18 (2H, m), 2.405 (3H, s), 2.413 (3H, s), 2.42 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.02-3.12 (2H, m), 3.18-3.46 (20H, m), 7.26-7.36 (10H, m), 7.70-7.82 (10H, m). FAB MS m/z : 1304 and 1306 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 20 の合成 (図 9)

化合物 17 (1.19 g、1.10 mmol)、四臭化炭素 (1.20 g、3.61 mmol)、トリフェニルホスフィン (0.947 g、3.61 mmol) から、化合物 19 の合成と同様に操作し、化合物 20 (1.21 g) を白色の粉末として得た。収率 97% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz), 1.15-1.35 (18H, m), 1.44-1.56 (2H, m), 2.07-2.18 (2H, m), 2.405 (3H, s), 2.414 (3H, s), 2.42 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.03-3.10 (2H, m), 3.14-3.45 (20H, m), 7.26-7.36 (10H, m), 7.70-7.82 (10H, m). FAB MS m/z : 1248 and 1250 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 21 の合成 (図 9)

化合物 18 (1.00 g、0.886 mmol)、四臭化炭素 (1.06 g、3.19 mmol)、

トリフェニルホスフィン (0.837 g, 3.19 mmol) から、化合物 19 の合成と同様に操作し、化合物 21 (1.05 g) を白色の粉末として得た。収率 99% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.87 (3H, t, $J=7.0$ Hz), 1.16-1.34 (10H, m), 1.44-1.55 (2H, m), 2.07-2.18 (2H, m), 2.405 (3H, s), 2.413 (3H, s), 2.42 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.03-3.10 (2H, m), 3.19-3.44 (20H, m), 7.26-7.36 (10H, m), 7.70-7.84 (10H, m). FAB MS m/z : 1192 and 1194 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 22 の合成 (図 10)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.0404 g, 1.01 mmol) をジメチルホルムアミド (28 ml) に懸濁させ、氷冷下にてテトラエチレンペンタミンペンタトシレート (化合物 11、0.404 g, 0.421 mmol) のジメチルホルムアミド (2 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下化合物 19 (1.32 g, 1.01 mmol) のジメチルホルムアミド (4 ml) 溶液を滴下した。反応液を室温で 18 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (60 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。ヘキサン-酢酸エチル (2:1) で溶出される粗生成物を、液体中圧クロマトグラフィー (ローバー B カラム) で精製した。ヘキサン-酢酸エチル (3:2) で溶出される分画を集めて、表記の化合物 (1.07 g) を白色の粉末として得た。収率 75% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.88 (6H, t, $J=7.0$ Hz), 1.15-1.35 (52H, m), 1.43-1.56 (4H, m), 1.90-2.04 (4H, m), 2.36 (12H, s), 2.37 (3H, s), 2.38 (12H, s), 2.39 (12H, s), 2.41 (6H, s), 3.02-3.46 (60H, m), 7.24-7.33 (30H, m), 7.67-7.82 (30H, m).

化合物 23 の合成 (図 10)

化合物 1 1 (0.384 g、0.399 mmol) および化合物 2 0 (1.20 g、0.959 mmol) から、化合物 2 2 の合成と同様に操作し、化合物 2 3 (1.02 g) を白色の粉末として得た。収率 77% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.88 (6H, t, $J=7.0$ Hz), 1.15-1.35 (36H, m), 1.43-1.56 (4H, m), 1.90-2.04 (4H, m), 2.36 (12H, s), 2.37 (3H, s), 2.38 (12H, s), 2.39 (12H, s), 2.41 (6H, s), 3.02-3.46 (60H, m), 7.23-7.34 (30H, m), 7.67-7.82 (30H, m).

化合物 2 4 の合成 (図 1 0)

化合物 1 1 (0.387 g、0.402 mmol) および化合物 2 1 (1.15 g、0.966 mmol) から、化合物 2 2 の合成と同様に操作し、化合物 2 4 (0.962 g) を白色の粉末として得た。収率 75% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.87 (6H, t, $J=7.0$ Hz), 1.15-1.35 (20H, m), 1.42-1.56 (4H, m), 1.90-2.04 (4H, m), 2.36 (12H, s), 2.37 (3H, s), 2.38 (12H, s), 2.39 (12H, s), 2.41 (6H, s), 3.02-3.46 (60H, m), 7.23-7.34 (30H, m), 7.66-7.82 (30H, m).

化合物 2 5 の合成 (図 1 0)

化合物 2 2 (0.752 g、0.220 mmol) に 25%臭化水素・酢酸溶液 (15 ml) を加え、100°Cで 18 時間反応させた。放冷後、溶媒を溜去して得られる残渣にエーテルを添加し、濾過することにより表記の化合物 HBr 塩 (0.395 g) を白色の粉末として得た。収率 78% ; $^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 0.83 (6H, t, $J=7.1$ Hz), 1.18-1.45 (52H, m), 1.63-1.76 (4H, m), 2.15-2.28 (4H, m), 3.07-3.16 (4H, m), 3.22-3.33 (8H, m), 3.40-3.64 (48H, m). FAB MS m/z : 1096 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 2 6 の合成 (図 1 0)

化合物 2 3 (0.814 g、0.247 mmol) から化合物 2 5 の合成と同様に操

作し、表記の化合物 HBr 塩 (0.429 g) を白色の粉末として得た。収率 79% ; $^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 0.85 (6H, t, $J=7.1$ Hz), 1.18-1.44 (36H, m), 1.63-1.76 (4H, m), 2.14-2.27 (4H, m), 3.08-3.16 (4H, m), 3.25-3.34 (8H, m), 3.43-3.64 (48H, m). FAB MS m/z : 984 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 27 の合成 (図 10)

化合物 24 (0.808 g、0.254 mmol) から化合物 25 の合成と同様に操作し、表記の化合物 HBr 塩 (0.451 g) を白色の粉末として得た。収率 85% ; $^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 0.85 (6H, t, $J=7.0$ Hz), 1.18-1.45 (20H, m), 1.63-1.76 (4H, m), 2.14-2.29 (4H, m), 3.08-3.16 (4H, m), 3.25-3.33 (8H, m), 3.43-3.63 (48H, m). FAB MS m/z : 872 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

【実施例 20】 アルキル化直鎖スベルミンの合成

図 12-15 に示した合成ルートに従い、図 16 に示した 5 種のアルキル化直鎖型スベルミンを合成した。以下に合成法を示す。

化合物 28 の合成 (図 12)

スベルミン四塩酸塩 (10.2g、29.4 mmol) から、Raymond らの方法 (J. Med. Chem. 1988, 31, 1183-1190) に従い、化合物 28 (22.6 g) を白色の粉末として得た。収率 94%.

化合物 29 の合成 (図 12)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.313 g、7.81 mmol) をジメチルホルムアミド (90 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 28 (5.33 g、6.51 mmol) のジメチルホルムアミド (10 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下 1-ブロモヘキサデカン (2.39 ml、7.81 mmol) を滴

下した。反応液を室温で6時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで2回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル(130 g)を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル(2:1)で溶出された分画を集めて、化合物29(2.30 g)を粘稠な油状物として得た。収率34%； $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.88 (3H, t, $J=6.8$ Hz), 1.13-1.35 (26H, m), 1.37-1.49 (2H, m), 1.50-1.59 (4H, m), 1.74-1.90 (4H, m), 2.36 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.43 (3H, s), 2.96-3.16 (14H, m), 5.30 (1H, t, $J=6.4$ Hz), 7.24-7.34 (8H, m), 7.61-7.77 (8H, m). FAB MS m/z : 1042 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物30の合成(図12)

化合物28(4.06 g、4.88 mmol)および1-ブロモデカン(1.40 ml、5.86 mmol)から、化合物29の合成と同様に操作し、化合物30(1.73 g)を油状物として得た。収率36%； $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz), 1.12-1.36 (18H, m), 1.37-1.49 (2H, m), 1.50-1.63 (4H, m), 1.72-1.90 (4H, m), 2.36 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.43 (3H, s), 2.95-3.22 (14H, m), 5.30 (1H, t, $J=6.6$ Hz), 7.24-7.34 (8H, m), 7.60-7.76 (8H, m). APCI MS m/z : 987 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物31の合成(図12)

化合物28(4.00 g、4.88 mmol)および1-ブロモオクタン(1.02 ml、5.86 mmol)から、化合物29の合成と同様に操作し、化合物31(1.73 g)を油状物として得た。収率38%； $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.87 (3H, t, $J=7.0$ Hz), 1.13-1.36 (10H, m), 1.38-1.47 (2H, m), 1.51-1.60 (4H, m), 1.72-1.90 (4H, m), 2.35 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.43

(3H, s), 2.95-3.22 (14H, m), 5.30 (1H, t, $J=6.8$ Hz), 7.24-7.35 (8H, m), 7.61-7.76 (8H, m). APCI MS m/z : 931 $[M+H]^+$.

化合物 3 2 の合成 (図 1 2)

化合物 2 8 (5.06 g、6.10 mmol) および 1-ブロモブタン (797 μ l、7.33 mmol) から、化合物 2 9 の合成と同様に操作し、化合物 3 2 (2.11 g) を油状物として得た。収率 39% ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.87 (3H, t, $J=7.3$ Hz), 1.16-1.34 (2H, m), 1.36-1.48 (2H, m), 1.50-1.64 (4H, m), 1.68-1.94 (4H, m), 2.35 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.43 (3H, s), 2.90-3.22 (14H, m), 5.30 (1H, t, $J=6.6$ Hz), 7.20-7.38 (8H, m), 7.64-7.77 (8H, m). APCI MS m/z : 875 $[M+H]^+$.

化合物 3 3 の合成 (図 1 2)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.582 g、14.5 mmol) をジメチルホルムアミド (85 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 2 8 (4.96 g、6.06 mmol) のジメチルホルムアミド (15 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下 3-[(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ]-1-ブロモプロパン (3.68 g、14.5 mmol) を滴下した。反応液を室温で 16 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (160 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (3:1) で溶出された分画を集めて、化合物 3 3 (5.94 g) を油状物として得た。収率 84% ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.022 (12H, s), 0.84-0.91 (18H, m), 1.46-1.62 (4H, m), 1.62-1.76 (4H, m), 1.78-1.96 (4H, m), 2.41 (6H, s), 2.42 (6H, s), 3.00-3.26 (16H, m), 3.56 (4H, t, $J=5.9$ Hz), 7.25-7.34 (8H, m), 7.63-7.71 (8H, m). FAB MS m/z : 1185 $[M+Na]^+$.

化合物 3 4 の合成 (図 1 2)

化合物 3 3 (5.94g、5.10mmol) のテトラヒドロフラン (100ml) 溶液に、テトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン (1M) 溶液 (12.2ml、12.2mmol) を氷冷下にて滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、反応液を水で希釈し、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮し、得られた残渣をシリカゲル (120g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。ヘキサン-酢酸エチル (1:4) で溶出された分画を集めて、表記の化合物 (4.55g) を白色の粉末として得た。収率 95% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.54-1.68 (4H, m), 1.70-1.82 (4H, m), 1.83-1.96 (4H, m), 2.42 (6H, s), 2.43 (6H, s), 2.52 (2H, t, $J=5.8$ Hz, -OH), 3.06-3.26 (16H, m), 3.70 (4H, q, $J=5.7$ Hz), 7.25-7.35 (8H, m), 7.62-7.73 (8H, m). FAB MS m/z : 935 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 3 5 の合成 (図 1 2)

化合物 3 4 (4.55g、4.87mmol) と四臭化炭素 (7.75g、23.4mmol) のメチレンクロリド (80ml) 溶液に、トリフェニルホスフィン (6.14g、23.4mmol) を氷冷下で加えた。氷冷下で 1 時間攪拌した後、反応液を減圧下で乾固した。得られた残渣をシリカゲル (150g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。0.5% メタノール-メチレンクロリドで溶出された分画を集めて、表記の化合物 (4.37g) を白色の粉末として得た。収率 90% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.52-1.68 (4H, m), 1.80-1.94 (4H, m), 2.04-2.18 (4H, m), 2.42 (12H, s), 3.07-3.26 (16H, m), 3.39 (4H, t, $J=6.4$ Hz), 7.23-7.37 (8H, m), 7.60-7.77 (8H, m). APCI MS m/z : 1059, 1061 and 1063 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 3 6 の合成 (図 1 3)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.209g、5.23mmol) をジメチルホルムアミド (45ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 2 9 (2.27g、2.18mmol) のジメチルホルムアミド (8ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、氷冷下化合物 3 5 (0.964g、0.908mmol) のジメチルホルムアミド (7ml) 溶液を滴下した。反応液を室温で 2 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣を少量のメチレンクロリドに溶解し、さらに酢酸エチルを過剰に加えて室温で 3 時間放置した。析出した結晶を吸引濾過にて回収して、表記の化合物 (2.04g) を白色の粉末として得た。収率 75%。¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.88 (6H, t, J=7.0Hz), 1.15-1.35 (52H, m), 1.37-1.47 (4H, m), 1.48-1.61 (14H, m), 1.74-1.94 (14H, m), 2.39 (36H, s), 2.95-3.22 (48H, m), 7.24-7.33 (24H, m), 7.58-7.75 (24H, m)。

化合物 3 7 の合成 (図 1 3)

化合物 3 0 (1.73 g、1.79 mmol) および 化合物 3 5 (0.844 g、0.795 mmol) から、化合物 3 6 の合成と同様に操作し、化合物 3 7 (1.09 g) を白色の粉末として得た。収率 48% ; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.88 (6H, t, J=7.0Hz), 1.12-1.36 (36H, m), 1.38-1.46 (4H, m), 1.48-1.63 (14H, m), 1.74-1.92 (14H, m), 2.39 (36H, s), 2.95-3.25 (48H, m), 7.20-7.35 (24H, m), 7.55-7.75 (24H, m)。FAB MS m/z : 2871 [M+H]⁺。

化合物 3 8 の合成 (図 1 3)

化合物 3 1 (1.73 g、1.86 mmol) および 化合物 3 5 (0.820 g、0.773 mmol) から、化合物 3 6 の合成と同様に操作し、化合物 3 8 (1.39 g)

を白色の粉末として得た。収率 65% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.87 (6H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 1.10-1.33 (20H, m), 1.38-1.47 (4H, m), 1.48-1.63 (14H, m), 1.74-1.94 (14H, m), 2.39 (36H, s), 3.00-3.15 (48H, m), 7.23-7.33 (24H, m), 7.60-7.75 (24H, m). FAB MS m/z : 2783 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

化合物 39 の合成 (図 13)

化合物 32 (1.59 g、1.83 mmol) および 化合物 35 (0.882 g、0.831 mmol) から、化合物 36 の合成と同様に操作し、化合物 39 (1.33 g) を白色の粉末として得た。収率 60% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.86 (6H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 1.26-1.27 (4H, m), 1.34-1.48 (4H, m), 1.48-1.66 (14H, m), 1.74-1.94 (14H, m), 2.39 (36H, s), 2.95-3.25 (48H, m), 7.22-7.36 (24H, m), 7.55-7.75 (24H, m). FAB MS m/z : 2649 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 40 の合成 (図 13)

化合物 36 (1.01 g、0.339 mmol) に 25%臭化水素・酢酸溶液 (10 ml) を加え、100°C で 6 時間反応させた。さらに 25%臭化水素・酢酸溶液 (10 ml) を追加して 100°C で 19 時間反応させた。放冷後、溶媒を溜去して得られる残渣にエーテルを添加し、濾過することにより表記の化合物 HBr 塩 (0.628 g) を得た。収率 88% ; $^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 0.88 (6H, s), 1.20-1.45 (52H, m), 1.50-1.70 (4H, m), 1.75-1.90 (14H, m), 2.05-2.25 (14H, m), 3.00-3.30 (48H, m), APCI MS m/z : 1135 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 41 の合成 (図 13)

化合物 37 (1.09 g、0.379 mmol) から、化合物 40 の合成と同様に操作し、化合物 41 (0.541 g) を得た。収率 72% ; $^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 0.85 (6H, t, $J=7.1\text{Hz}$), 1.18-1.43 (36H, m), 1.60-1.72 (4H, m),

1.73-1.90 (14H, m), 2.00-2.20 (14H, m), 3.00-3.30 (48H, m), APCI MS
m/z : 1023 [M+H]⁺.

化合物 4 2 の合成 (図 1 3)

化合物 3 8 (1.03 g、0.363 mmol) から、化合物 4 0 の合成と同様に
操作し、化合物 4 2 (0.280 g) を得た。収率 41% ; ¹H NMR (D₂O) δ :
0.85 (6H, t, J=7.0Hz), 1.23-1.42 (20H, m), 1.60-1.73 (4H, m),
1.74-1.89 (14H, m), 2.00-2.22 (14H, m), 3.00-3.32 (48H, m), APCI MS
m/z : 911 [M+H]⁺.

化合物 4 3 の合成 (図 1 3)

化合物 3 9 (1.14 g、0.430 mmol) から、化合物 4 0 の合成と同様に
操作し、化合物 4 3 (0.571 g) を得た。収率 75% ; ¹H NMR (D₂O) δ :
0.91 (6H, t, J=7.6Hz), 1.30-1.49 (4H, m), 1.57-1.72 (4H, m),
1.73-1.90 (14H, m), 2.03-2.23 (14H, m), 3.00-3.32 (48H, m), APCI MS
m/z : 799 [M+H]⁺.

化合物 4 4 の合成 (図 1 4)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.544 g、13.6 mmol) をジメチル
ホルムアミド (180 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 2 8 (10.1 g、
12.4 mmol) のジメチルホルムアミド (20 ml) 溶液を滴下した。室温で
1 時間攪拌した後、氷冷下 3-[(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ]-1-
プロモプロパン (3.44 g、13.6 mmol) を滴下した。反応液を室温で 17
時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合
わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル
(250 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エ

チル (1:1) で溶出された分画を集めて、化合物 4 4 (4.52 g) を白色の粉末として得た。収率 37%。¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.017 (6H, s), 0.84-0.89 (9H, s), 1.48-1.58 (4H, m), 1.60-1.71 (2H, m), 1.72-1.93 (4H, m), 2.41 (4H, s), 2.42 (4H, s), 2.43 (4H, s), 2.93-3.25 (14H, m), 3.55 (2H, t, J=6.0 Hz), 5.30 (1H, t, J=6.4 Hz), 7.23-7.34 (8H, m), 7.55-7.77 (8H, m). APCI MS m/z: 991 [M+H]⁺.

化合物 4 5 の合成 (図 1 4)

水素化ナトリウム (60%鉱油懸濁物、0.0499 g、1.24 mmol) をジメチルホルムアミド (20 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 4 4 (1.02 g、1.04 mmol) のジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌後、氷冷下にて化合物 3 5 (0.506g、0.471mmol) のジメチルホルムアミド (5ml) 溶液を滴下した。反応液を室温で 22 時間攪拌した後、水中に注ぎ、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (30 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (1:1) で残存する化合物 4 4 を溶出した後、5% メタノール-メチレンクロリドで溶出された分画を集めて、化合物 4 5 (0.92 g) を白色の粉末として得た。収率 68% ; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.013 (12H, m), 0.85-0.88 (18H, m), 1.45-1.58 (14H, m), 1.60-1.74 (4H, m), 1.76-1.94 (14H, m), 2.30-2.48 (36H, m), 2.95-3.25 (48H, m), 3.54 (4H, t, J=6.0 Hz), 7.23-7.34 (24H, m), 7.58-7.73 (24H, m).

化合物 4 6 の合成 (図 1 4)

化合物 4 5 (0.901g、0.313mmol) のテトラヒドロフラン (18ml) 溶液に、テトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン (1M)

溶液 (0.75ml、0.75mmol) を氷冷下にて滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、反応液を水で希釈し、メチレンクロリドで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮し、得られた残渣をシリカゲル (17g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。2% メタノール-メチレンクロリドで溶出された分画を集めて、表記の化合物 (0.780g) を白色の粉末として得た。収率 94% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.46-1.60 (14H, m), 1.68-1.76 (4H, m), 1.78-1.94 (14H, m), 2.40 (36H, s), 2.47 (2H, t, $J=6.0$ Hz, -OH), 2.98-3.24 (48H, m), 3.67 (4H, q, $J=5.9\text{Hz}$), 7.24-7.33 (24H, m), 7.55-7.75 (24H, m).

化合物 47 の合成 (図 15)

化合物 46 (0.761g、0.286mmol) のメチレンクロリド (12ml) 溶液に四臭化炭素 (0.947g、2.86mmol) とトリフェニルホスフィン (0.750g、2.86mmol) を氷冷下で加えた。室温で 1.5 時間攪拌した後、反応液を減圧下で乾固した。得られた残渣をシリカゲル (40g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。ヘキサン-酢酸エチル (1:3) で溶出された分画を集めて、表記の化合物 (0.744g) を白色の粉末として得た。収率 94%。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.40-1.66 (14H, m), 1.74-1.97 (14H, m), 2.02-2.16 (4H, m), 2.40 (36H, s), 2.94-3.24 (48H, m), 3.37 (4H, t, $J=6.4$ Hz), 7.23-7.35 (8H, m), 7.55-7.77 (24H, m).

化合物 48 の合成 (図 15)

水素化ナトリウム (60% 鉱油懸濁物、0.0307 g、0.769 mmol) をジメチルホルムアミド (18 ml) に懸濁させ、氷冷下にて化合物 29 (0.668 g、0.641 mmol) のジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液を滴下した。室温で 1 時間攪拌後、氷冷下にて 化合物 47 (0.731g、0.263mmol) のジメチル

ルホルムアミド (5ml) 溶液を滴下した。反応液を室温で 4 時間攪拌した後、水中に注ぎ、メチレンクロリドで 2 回抽出した。抽出液を合わせて蒸留水、飽和食塩水で洗い、乾燥・濃縮した。残渣をシリカゲル (30 g) を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (1:1) で残存する化合物 29 を溶出した後、2% メタノール-メチレンクロリドで溶出された分画を集めて、化合物 48 (0.761 g) を白色の粉末として得た。収率 62% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.88 (6H, t, $J=6.4$ Hz), 1.12-1.34 (52H, m), 1.40-1.48 (4H, m), 1.49-1.62 (24H, m), 1.73-1.95 (4H, m), 2.38 (30H, s), 2.39 (30H, s), 2.97-3.27 (80H, m), 7.23-7.33 (40H, m), 7.55-7.74 (40H, m).

化合物 49 の合成 (図 15)

化合物 48 (0.742 g, 0.158 mmol) に 25%臭化水素・酢酸溶液 (15 ml) を加え、100°C で 4 時間反応させた。さらに 25%臭化水素・酢酸溶液 (7.5 ml) を追加して 100°C で 19 時間反応させた。放冷後、溶媒を溜去して得られる残渣にエーテルを添加し、濾過することにより表記の化合物 HBr 塩 (0.442 g) を得た。収率 86% ; $^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 0.93 (6H, m), 1.30-1.60 (52H, m), 1.70-1.80 (4H, m), 1.80-2.00 (24H, m), 2.10-2.35 (24H, m), 3.08-3.48 (80H, m). APCI MS m/z : 1619 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

【実施例 21】 ストック溶液の調製

実施例 19、20 で合成した 8 種の誘導体の HBr 塩を秤量、滅菌蒸留水を加え、1N-NaOH で pH を 7 付近に調製後各々のストック溶液を調製した。水で溶解し難い化合物は 80°C で 15-30 分加熱、室温に戻して pH 調製後、プローブ型超音波 (BRONSON 社、20 Duty cycle、5 分) で処理した。全てのキャリアー溶液は最後にフィルター (DISMIC-25cs、Cellulose

acetate, 0.2 μ m, ADVANTEC TOYO)で濾過した。キャリアー溶液の濃度はアミンニトロゲンのモル濃度とした。即ち、ストック溶液は 10mM の (10nmol/ μ l) 陽電荷モル数とした。これらのストック溶液は使用時まで 4°C で保存した。使用時、沈殿したストック溶液は一旦、80°C で 15-30 分加熱溶解して用いた。

〔実施例 22〕 アルキル化直鎖エチレンイミンの in vitro 遺伝子導入

アルキル化直鎖エチレンイミンのヒト肝癌細胞 (Hep G2) に対する遺伝子発現を検討した (表 3)。表中、数値は平均値 \pm SD (n=3) を示す。化合物は TEL-D8、TEL-D12、TEL-D16 を用い、方法は実施例 12-16 に準じた。これらの中で、TEL-D16 は最も高い遺伝子発現を示した。TEL-D16 の遺伝子発現はトランスフェクション時の血清添加の有無にかかわらず LipofectAMINE の約 10 倍高い値であった。

表 3

化合物名	化合物 番号	電荷比 (eq)	遺伝子発現 LacZ (RLU/ μ g \cdot sec)	
			No serum	50% Serum
TEL-D8	27	9	179 \pm 41	163 \pm 23
		18	177 \pm 67	146 \pm 20
TEL-D12	26	9	295 \pm 198	134 \pm 10
		18	4,130 \pm 3,316	128 \pm 6
TEL-D16	25	9	106,494 \pm 22,206	23,608 \pm 8,655
		18	155,013 \pm 8,191	17,593 \pm 6,292
LipofectAMINE			9,345 \pm 9,573	2,373 \pm 1,620

【実施例 2 3】 アルキル化直鎖スベルミンの *in vitro* 遺伝子導入
アルキル化直鎖スベルミンのヒト肝癌細胞 (Hep G2) に対する遺伝子発現を検討した。表中、数値は平均値 \pm SD ($n=3$)を示す。化合物は T 化合物は TSL-D4、TSL-D8、TSL-D12、TSL-D16、PSL-D16 を用い、方法は実施例 12-16 に準じた。

結果を表 4 に示した。トランスフェクション時、血清無添加の場合、LipofectAMINE の遺伝子発現に比べて、TSL-D8、TSL-D16 は 10 倍以上、また、PSL-D16 は 5 倍以上高い値を示した。一方、血清添加では TSL-D16 は LipofectAMINE の 10 倍以上高い値であった。

表 4.

化合物名	化合物 番号	電荷比 (eq)	遺伝子発現 LacZ (RLU/ μ g \cdot sec)	
			No serum	50% Serum
TSL-D4	43	9	140 \pm 14	142 \pm 5
		18	479 \pm 570	2,517 \pm 2,361
TSL-D8	42	9	163,488 \pm 55,392	269 \pm 5
		18	141,151 \pm 111,159	291 \pm 9
TSL-D12	41	9	1,999 \pm 2,270	144 \pm 3
		18	10 \pm 14	132 \pm 8
TSL-D16	40	9	142,963 \pm 26,041	50,683 \pm 8,892
		18	17,435 \pm 12,412	23,393 \pm 10,319
PSL-D16	49	9	63,231 \pm 16,415	6,721 \pm 2,608
		18	563 \pm 412	2,702 \pm 383
LipofectAMINE			9,345 \pm 9,573	2,373 \pm 1,620

【実施例 2 4】 ヒト膵臓癌細胞およびヒト神経膠芽腫細胞の調製
ヒト膵臓癌細胞 BxPc-3 (Primary pancreatic adenocarcinoma, 大日

本製薬株式会社より入手)を10%FBS(GIBCOBRL社製)を添加したRPMI培地(GIBCOBRL社製)で37°C、CO₂培養器で培養した。同様にヒト神経膠芽腫SK-N-MC(Glioblastoma, ATCCより入手)を10%FBSを添加したD-MEM培地(GIBCOBRL社製)で37°C、CO₂培養器で培養した。各々の細胞をtrypsin処理後、氷冷した各々の培地で3回洗浄後、 1×10^8 cells/mlとなるよう調製した。マウス皮下への移植は調製後40分以内に行った。

[実施例25] 皮下移植担癌マウスの作製

SCIDマウス(雄、5週令、日本クレア株式会社)の脇腹左右の2ヶ所および背部上下の2ヶ所の計4ヶ所の皮下に実施例24で調製した癌細胞各々0.2mlを投与した(注射針29Gx1/2〃、テルモ株式会社)。投与2週後、生着したヒト膀胱癌細胞BxPc-3の腫瘍径は縦0.5-0.8cm、横0.5-0.8cmであった。一方、ヒト神経膠芽腫SK-N-MCの腫瘍径は縦0.9-1.4cm、横1.1-1.75cmであった。

[実施例26] プラスミドの調製法

クラゲの緑色蛋白質のGFP(Clontech社、pEGFP-N1)をプラスミドpCAGGSに挿入したプラスミドpCAG-EGFPを構築した。このプラスミドのストック溶液(8mgDNA/ml TE)を5%グルコース(扶桑薬品工業株式会社、ブドウ糖注射液)で希釈し500 μ g DNA/mlのDNA溶液を調製した。1 μ gDNAの負電荷モル数は3nmol、500 μ gDNAの負電荷モル数は500 μ g x 3 nmol = 1,500nmolとした。

[実施例27] 各種誘導体キャリアー溶液の調製法

N/P(N:キャリアーのニトロゲンの陽電荷モル数/P:DNAのリン酸を負電荷モル数の比)が0.3等量となるよう実施例21のストック溶液を

5%グルコースで調製した。

〔実施例 28〕 DNA 複合体の形成法

1.5ml エッペンドルフチューブに実施例 26 の DNA 溶液 $100\mu\text{l}$ を入れ、次いで実施例 27 のキャリアー溶液 $100\mu\text{l}$ を加えて軽くボルテックスで混合後、室温で 30 分以上放置し、DNA 複合体 ($N/P=0.3$ 等量) を形成させた。一夜、 4°C で放置後、以下の実験に供した。

〔実施例 29〕 皮下移植担癌マウスでの遺伝子発現

実施例 28 の DNA 複合体 $50\mu\text{l}$ ($12.5\mu\text{gDNA}$) を実施例 25 の皮下移植担癌マウスの腫瘍内に直接投与した (注射針 $29\text{G}\times 1/2''$ 、テルモ株式会社)。DNA 複合体の投与 10 日後、マウスをエーテル麻酔下に頸椎脱臼屠殺し、生着した腫瘍を皮下から挟みで切り出した。GFP 遺伝子の発現は、腫瘍を切断し内部の腫瘍組織を蛍光顕微鏡で観察することで行った。結果は表 5 に示した。表中の GFP 発現強度において、(+) は強い発現、(±) は僅かな発現、(-) は発現なしを示す。ヒト膵臓癌細胞 BxPc-3 に対し、TSL-D8、TSL-D16、PSL-D16、TEL-D8、TEL-D16 が nakedDNA より強い GFP の蛍光が観察された。同様にヒト神経膠芽腫 SK-N-MC に対し、TEL-D8 が nakedDNA より強い GFP の蛍光が観察された。

表 5

化合物名	化合物 番号	マウス皮下腫瘍内遺伝子発現	
		BxPc-3	SK-N-MC
TEL-D8	27	++	±
TEL-D12	26	-	-
TEL-D16	25	++	±
TSL-D4	43	±	±
TSL-D8	42	++	++
TSL-D12	41	-	-
TSL-D16	40	++	±
PSL-D16	49	++	±
Naked DNA		±	- / ±

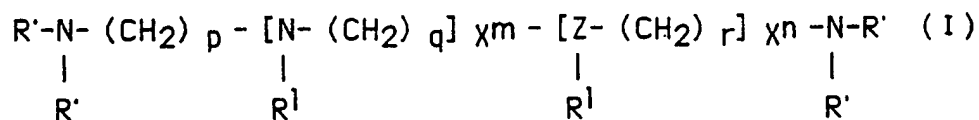
産業上の利用の可能性

本発明により、複数の疎水基を導入したポリアルキレンイミンを構成成分とする組成

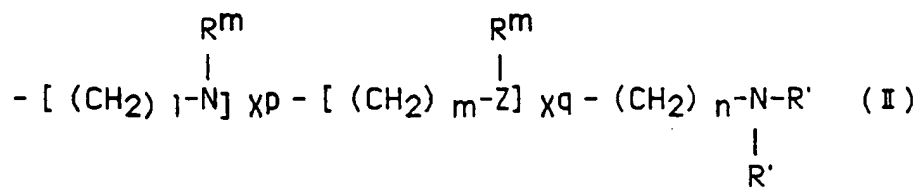
物、および該組成物を用いた遺伝子導入法が提供された。これにより、従来のカチオン性高分子に比し、より高い効率で、負電荷の生理活性物質を細胞内へ輸送することが可能となった。

請求の範囲

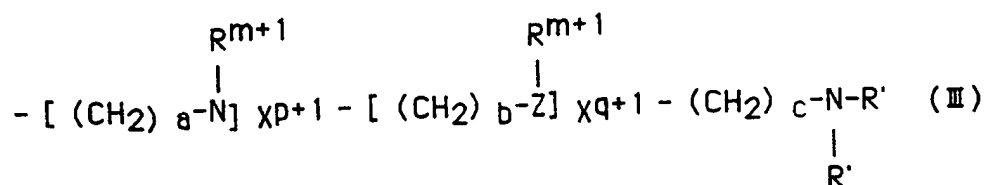
1. 疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含む組成物。
2. 疎水基がコレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、またはリン脂質残基である、請求項1に記載の組成物。
3. 疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンが下記構造式(I)で表される化合物である、請求項1に記載の組成物。



(式中、基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、Zは炭素原子もしくは窒素原子を表し、R'は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つのR'は同一であっても異なってもよく、側鎖R¹は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式(II)を表す。また、式中、p、q、r、Xⁿ、X^mは任意の自然数を表す。)



(式中、基本骨格および側鎖 R^m にアミド結合が含まれていてもよく、 Z は炭素原子もしくは窒素原子を表し、 R' は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つの R' は同一であっても異なってもよく、 R^m は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基、または次式 (III) を表す。また、式中、 l 、 m 、 n 、 X^p 、 X^q は任意の自然数を表す。)



(式中、基本骨格および側鎖 R^{m+1} の基本骨格にアミド結合が含まれていてもよく、 Z は炭素原子もしくは窒素原子を表し、 R' は水素、コレステロール基、飽和もしくは不飽和のアルキル基、飽和もしくは不飽和のアシル基、飽和もしくは不飽和のアシルオキシカルボニル基、リン脂質残基を表し、同一の窒素原子に結合する2つの R' は同一であっても異なってもよい。また、式中、 a 、 b 、 c 、 X^{p+1} 、 X^{q+1} は任意の自然数を表す。)

4. 基本骨格に次式 (IV) の繰り返し構造を含む、請求項1から3のいずれかに記載の組成物。



5. テトラエチレンペンタミンが2分子ないし5分子、直鎖状に連結した請求項4に記載の組成物。

6. R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、請求項5に記載の組成物。

7. R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、請求項5に記載の組成物。

8. 式(IV)を含む構造が分岐状に連結した請求項4に記載の組成物。

9. R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、請求項8に記載の組成物。

10. R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、請求項8に記載の組成物。

11. 基本骨格にスベルミン構造を含む、請求項1から3のいずれか

に記載の組成物。

12. スベルミンが2分子ないし5分子、直鎖状に連結した請求項11に記載の組成物。

13. R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、請求項11に記載の組成物。

14. R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、請求項11に記載の組成物。

15. スベルミン構造が分岐状に連結した請求項11に記載の組成物。

16. R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、およびエイコシル基からなる群より選択される基を含む、請求項14に記載の組成物。

17. R' 、 R^1 、 R^m 、 R^{m+1} の側鎖のいずれか2個以上が、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、およびオクタデシル基からなる群より選択される基を含む、請求項14に記載の組成物。

18. さらにリン脂質を含む、請求項1から17のいずれかに記載の組成物。

19. リン脂質が、中性リン脂質または酸性リン脂質である、請求項18に記載の組成物。

20. リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン骨格またはホスファチジルコリン骨格を有する、請求項19に記載の組成物。

21. リン脂質が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンである、請求項20に記載の組成物。

22. 負電荷を有する生理活性物質と、請求項1から21のいずれかに記載の組成物を含む複合体。

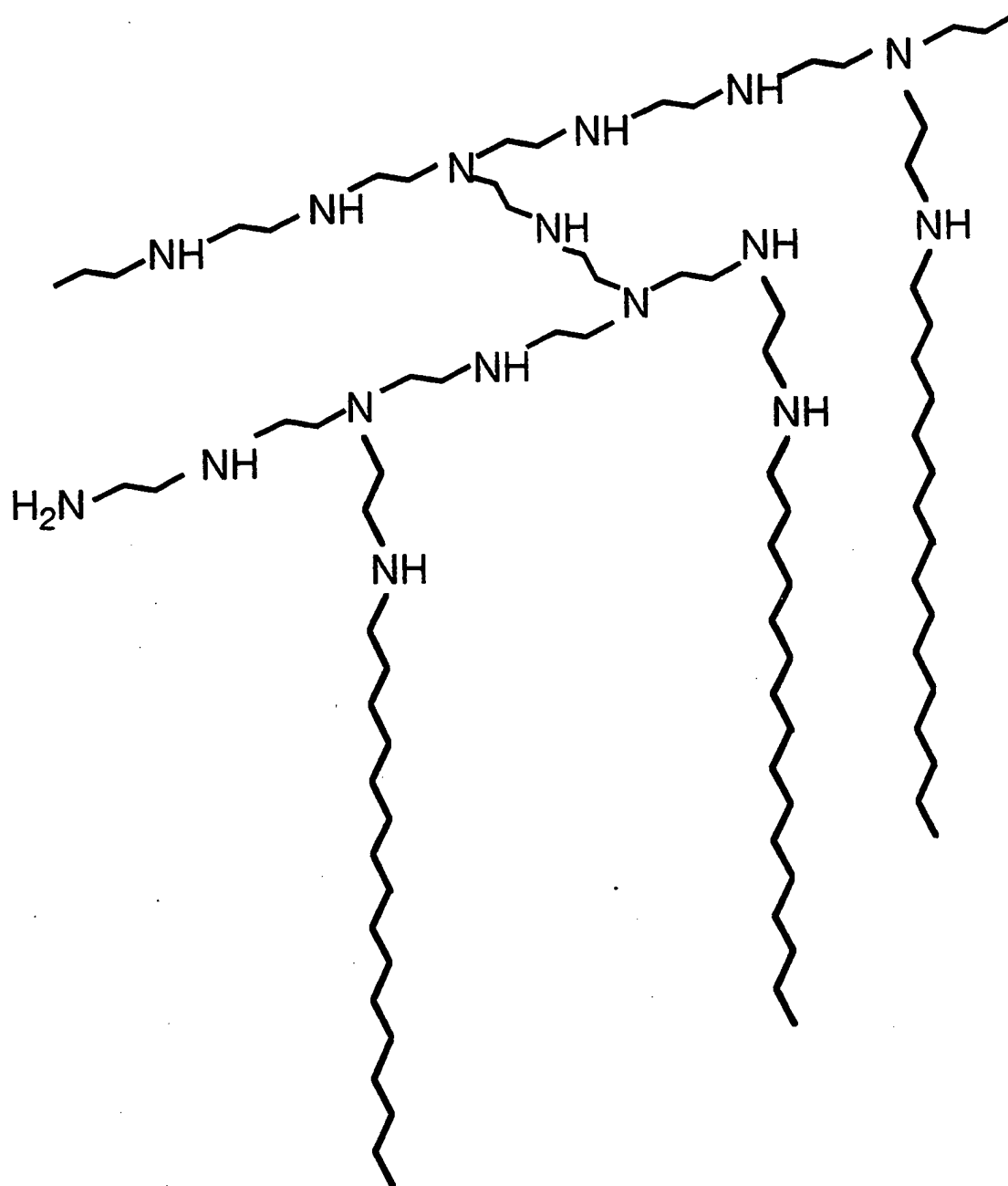
23. 負電荷を有する生理活性物質が、核酸またはその誘導体である、請求項22に記載の組成物を含む複合体。

24. 請求項22または23に記載の複合体を細胞に接触させる工程を含む、負電荷を有する生理活性物質を細胞内へ導入する方法。

25. 請求項19から21のいずれかに記載の組成物を製造するための、リン脂質および疎水基が一分子中に2個以上導入されたポリアルキレンイミンまたはその塩を含むキット。

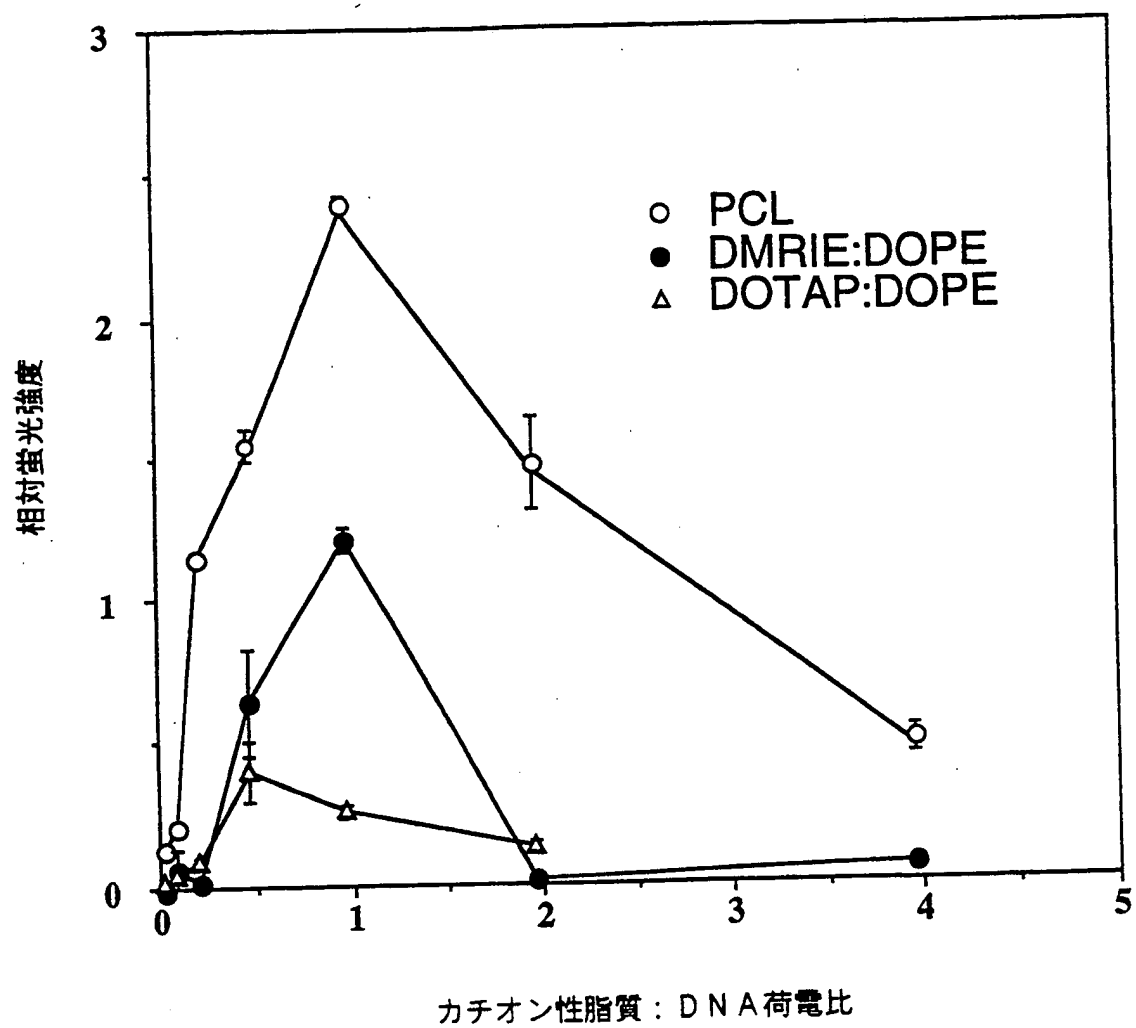
1/16

図 1



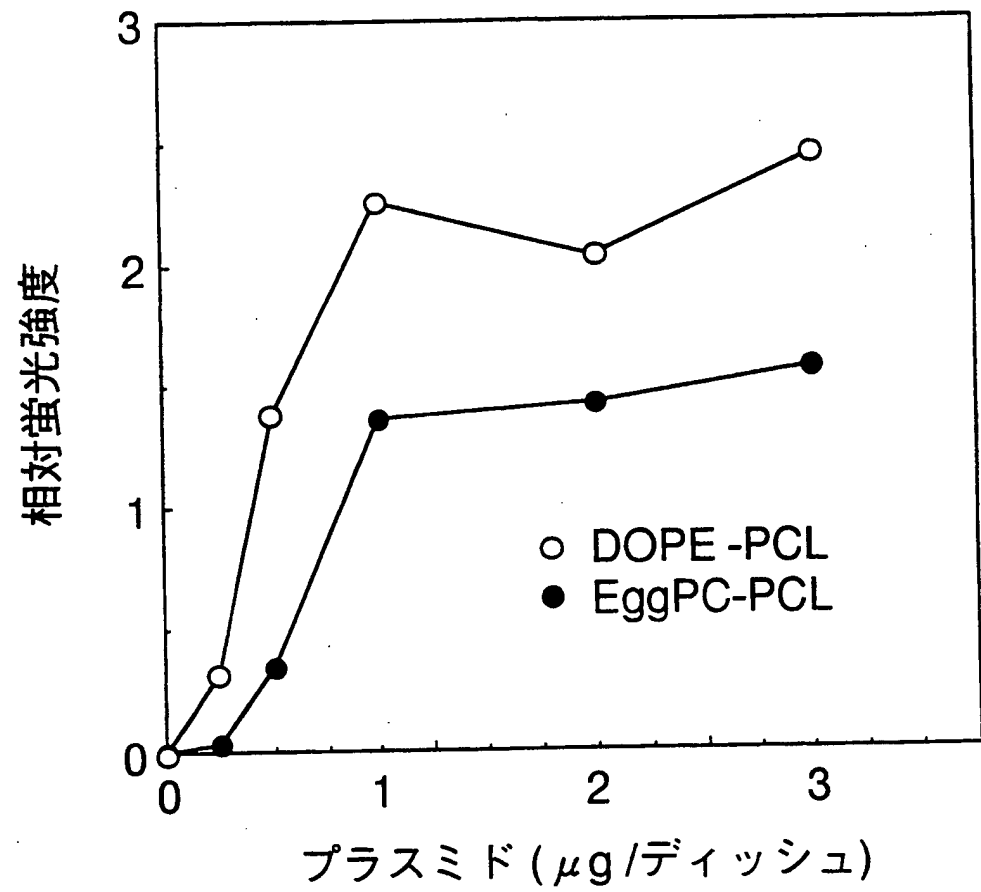
2 / 16

図 2



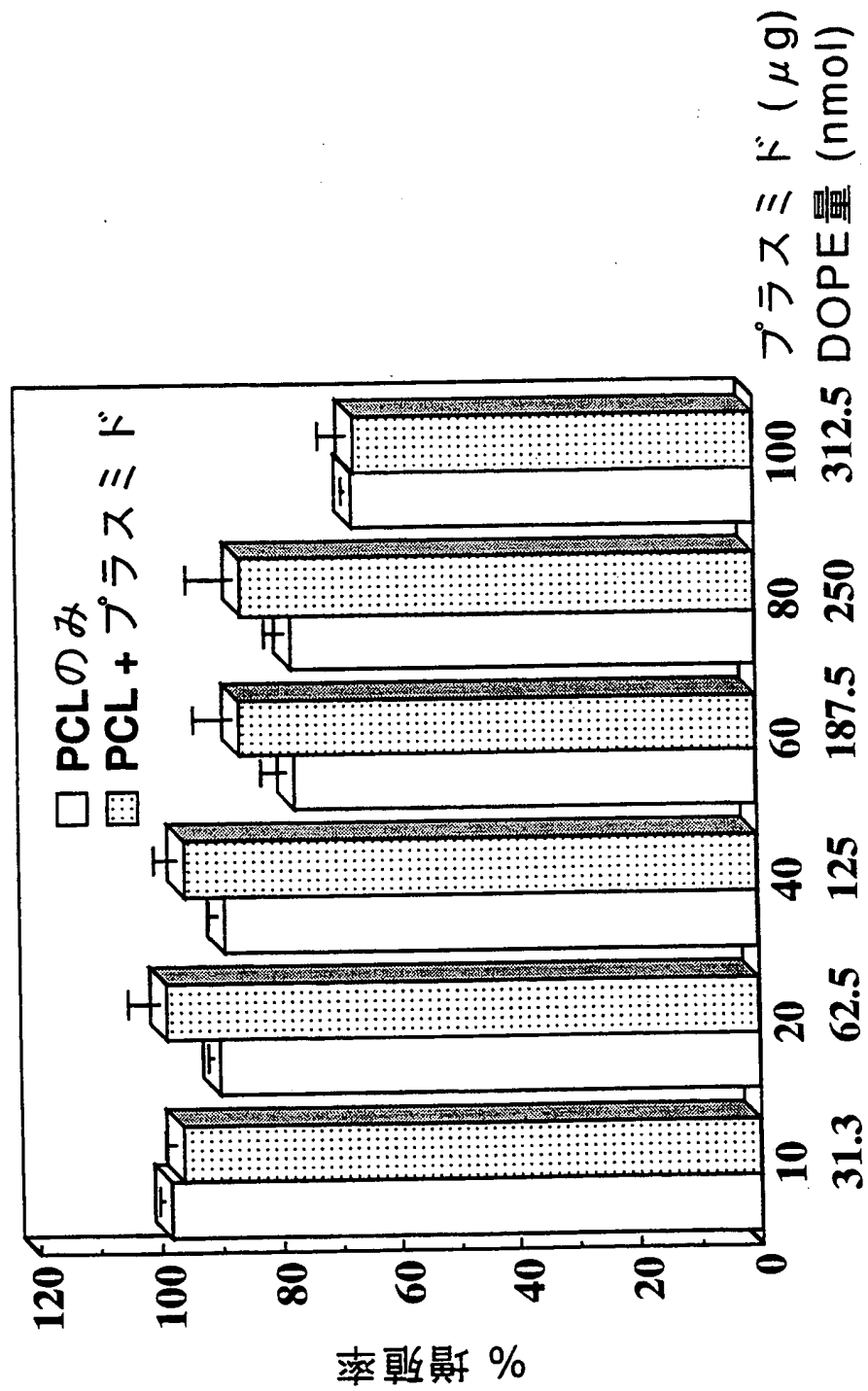
3/16

図 3



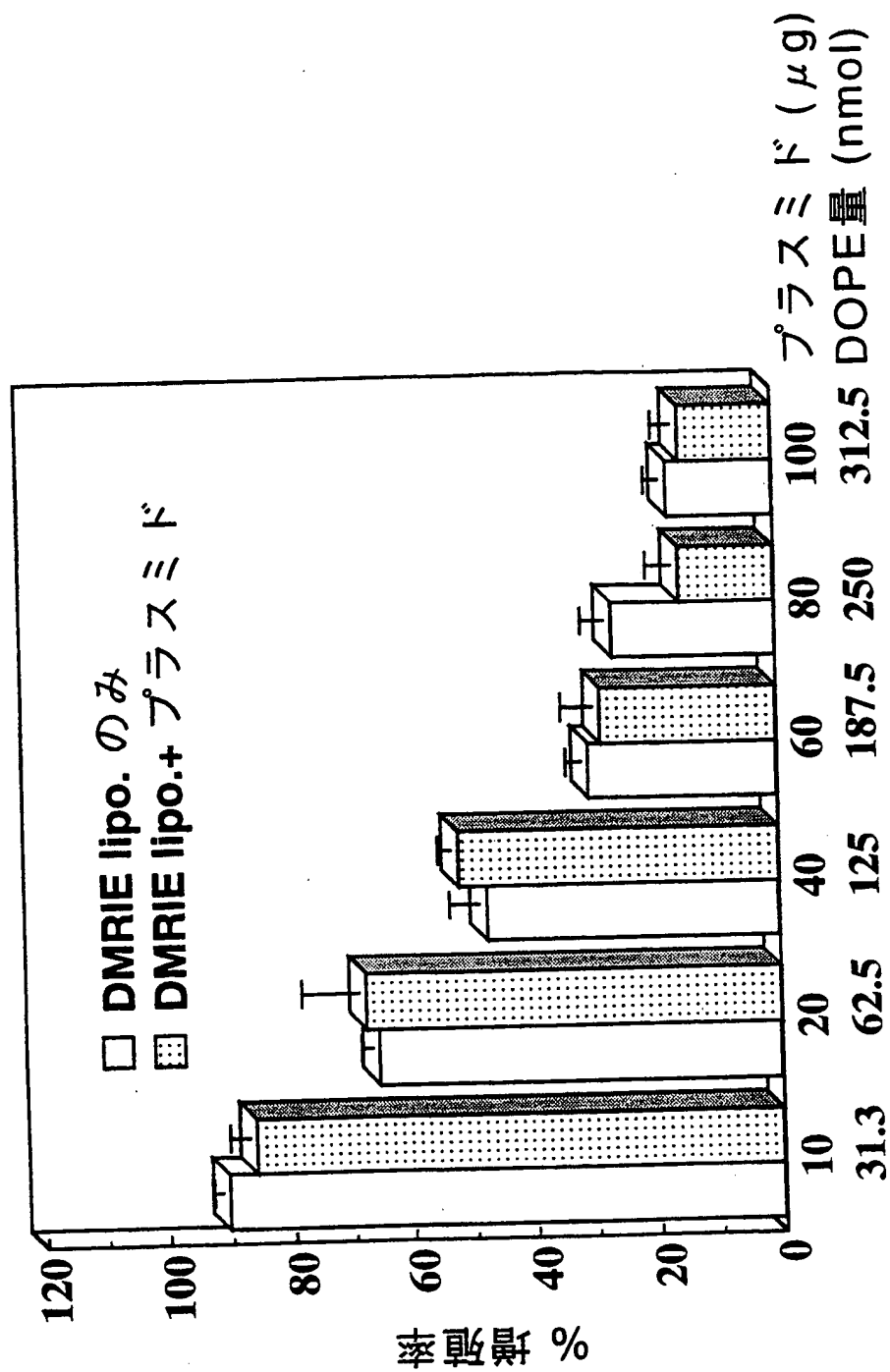
4/16

図 4



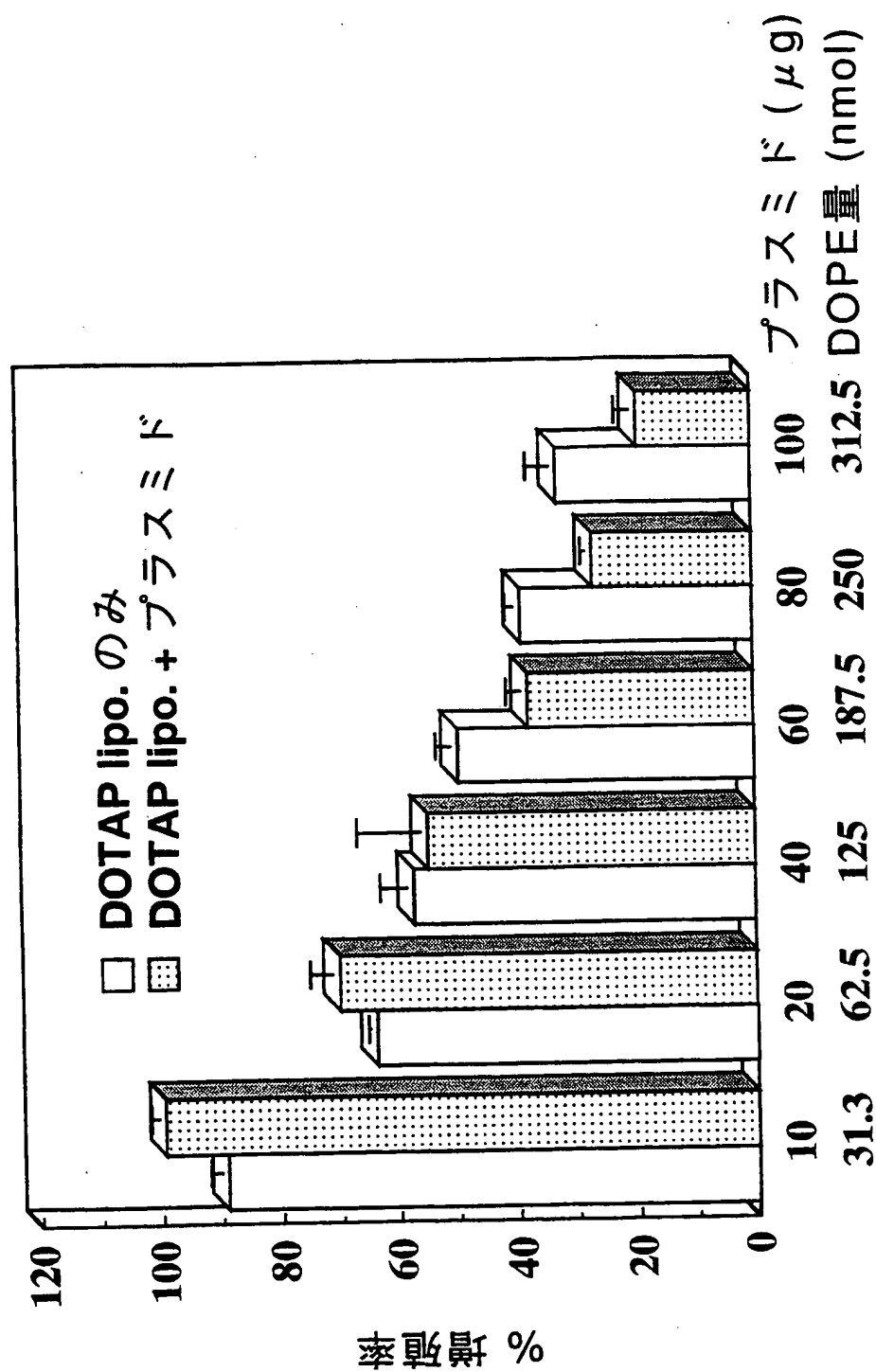
5 / 16

図 5



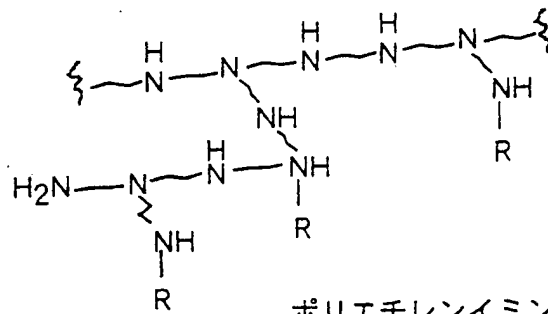
6 / 16

図 6



7 / 16

図 7

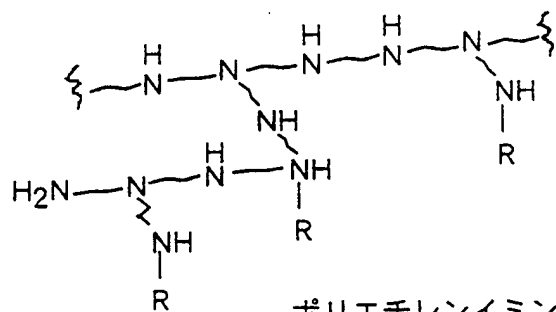


ポリエチレンイミン
MW 約600

化合物名	化合物 番号	R	アルキル導入率 mol%
P6	1	H	0
P6D20.3	2	C ₁₀ H ₂₁ (Decyl)	20.3
P6L18.4	3	C ₁₂ H ₂₅ (Lauryl)	18.4
P6M18.8	4	C ₁₄ H ₂₉ (Myristyl)	18.8
P6C17.5	5	C ₁₆ H ₃₃ (Cetyl)	17.5
P6C24.5	6	C ₁₆ H ₃₃ (Cetyl)	24.5
P6S21.2	7	C ₁₈ H ₃₇ (Stearyl)	21.2
P6S11.3	8	C ₁₈ H ₃₇ (Stearyl)	11.3

8/16

図 8

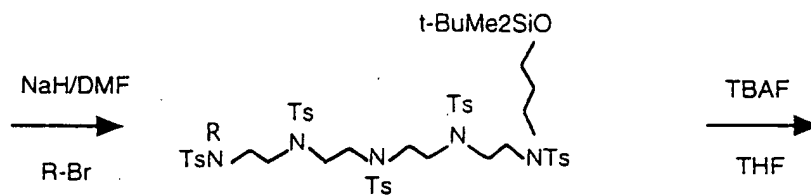
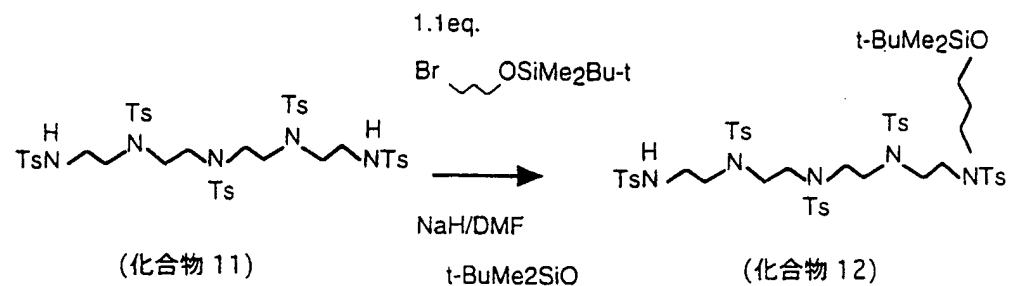
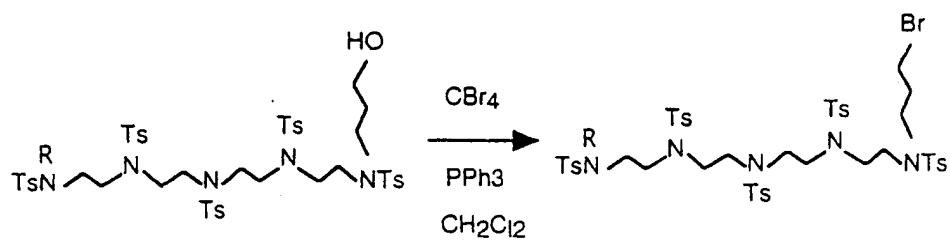


ポリエチレンイミン
MW 約1,800

化合物名	化合物 番号	R	アルキル導入率 mol%
P18		H	0
P18C12.3	9	C ₁₆ H ₃₃ (Cetyl)	12.3
P18C20.6	10	C ₁₆ H ₃₃ (Cetyl)	20.6

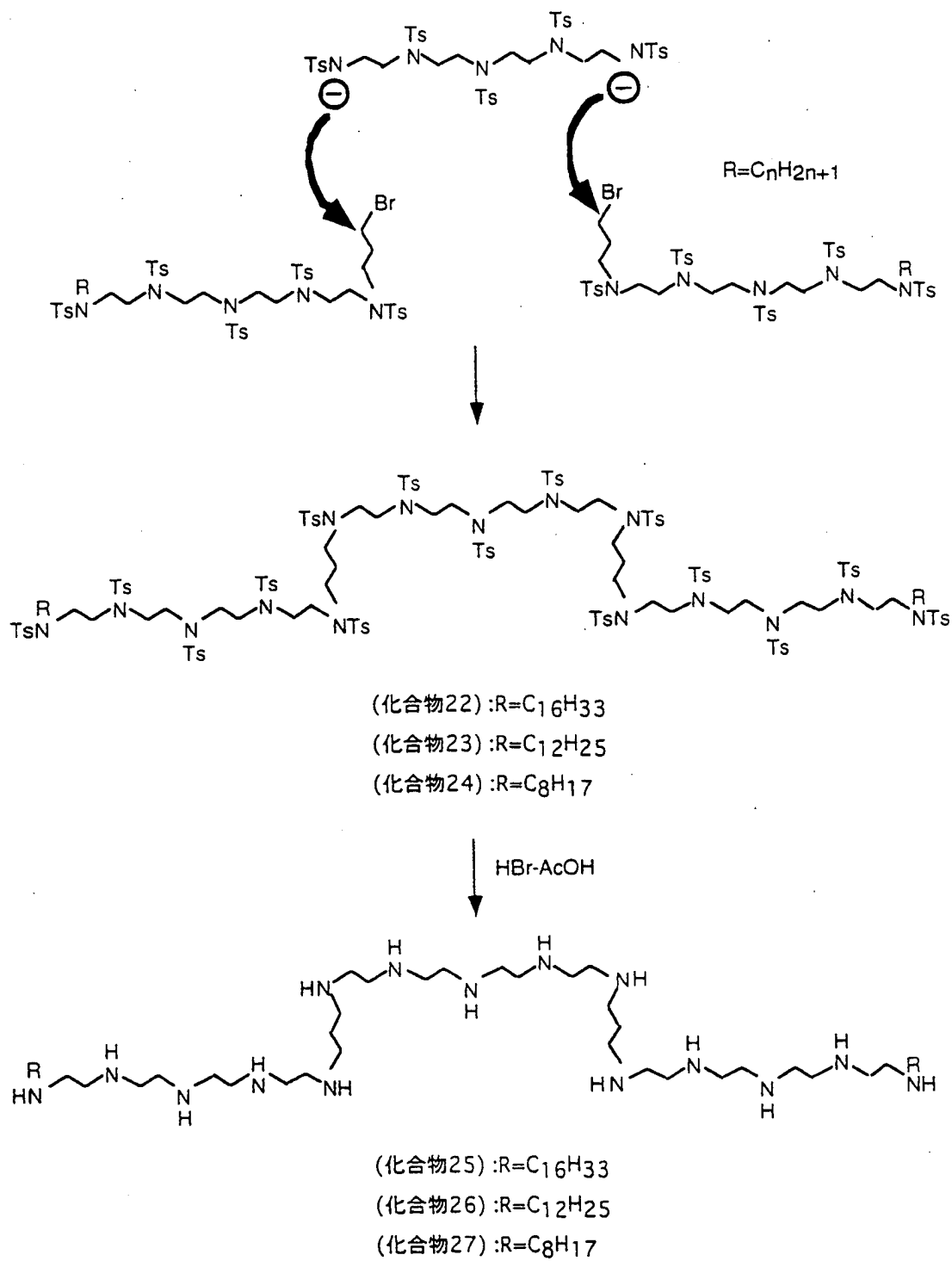
9 / 16

図 9

(化合物 13) : R=C₁₆H₃₃(化合物 14) : R=C₁₂H₂₅(化合物 15) : R=C₈H₁₇(化合物 16) : R=C₁₆H₃₃(化合物 17) : R=C₁₂H₂₅(化合物 18) : R=C₈H₁₇(化合物 19) : R=C₁₆H₃₃(化合物 20) : R=C₁₂H₂₅(化合物 21) : R=C₈H₁₇

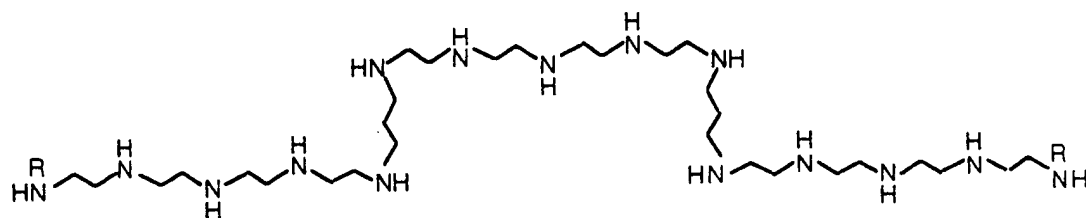
10/16

図 10



11/16

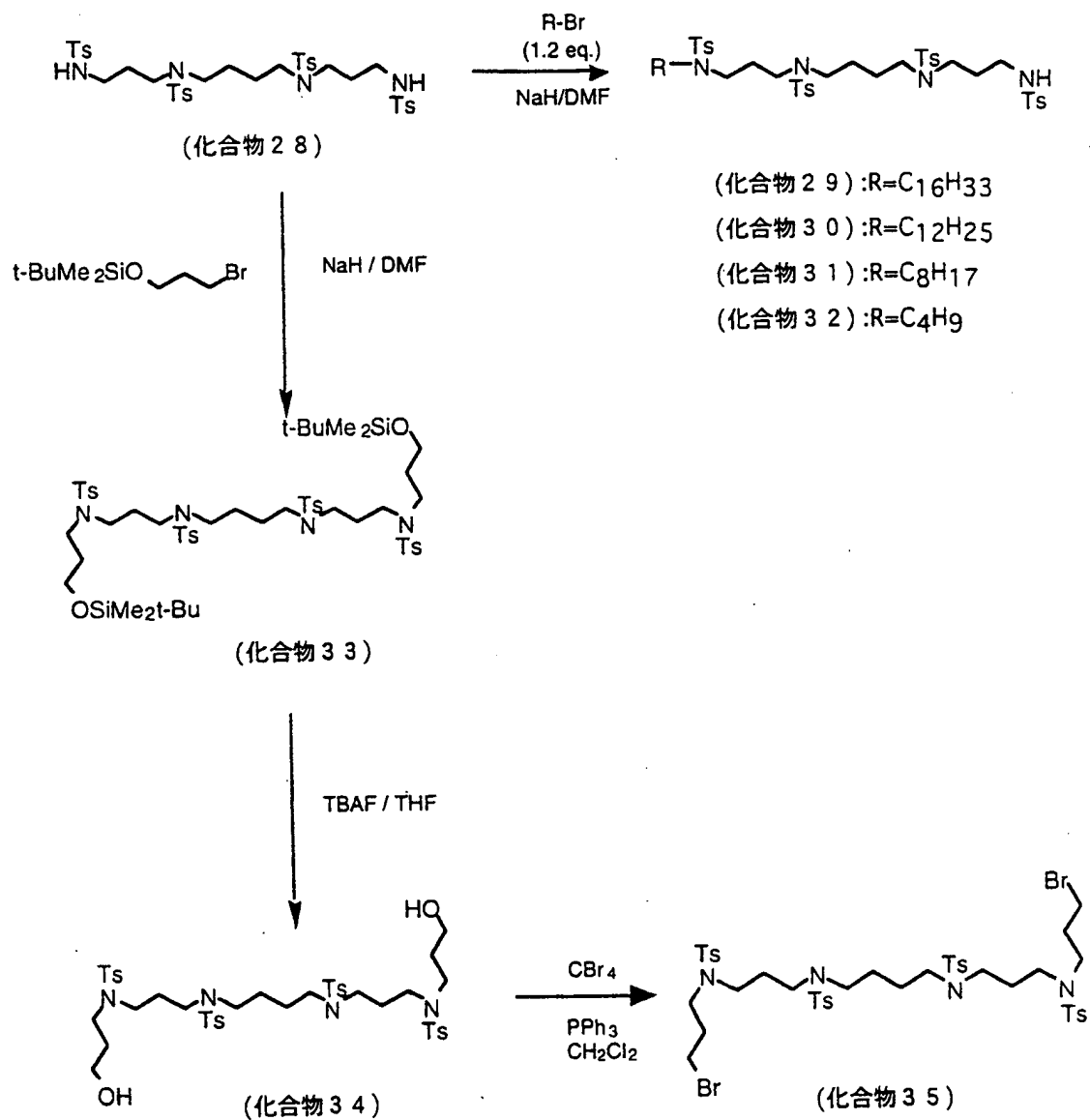
図 11



化合物名	化合物番号	R
TEL-D16	25	C ₁₆ H ₃₃ (Cetyl)
TEL-D12	26	C ₁₂ H ₂₅ (Lauryl)
TEL-D8	27	C ₈ H ₁₇ (Octyl)

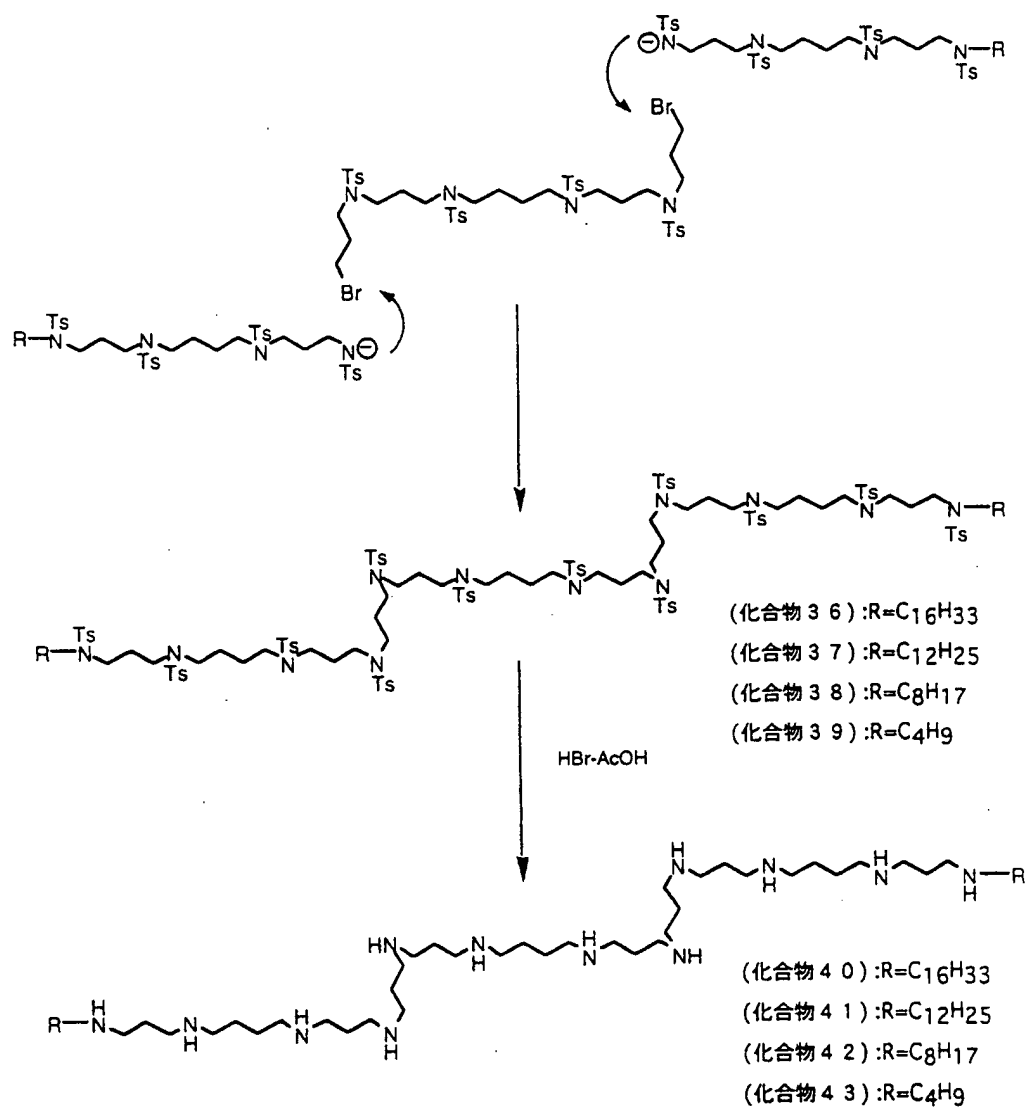
12 / 16

図 12



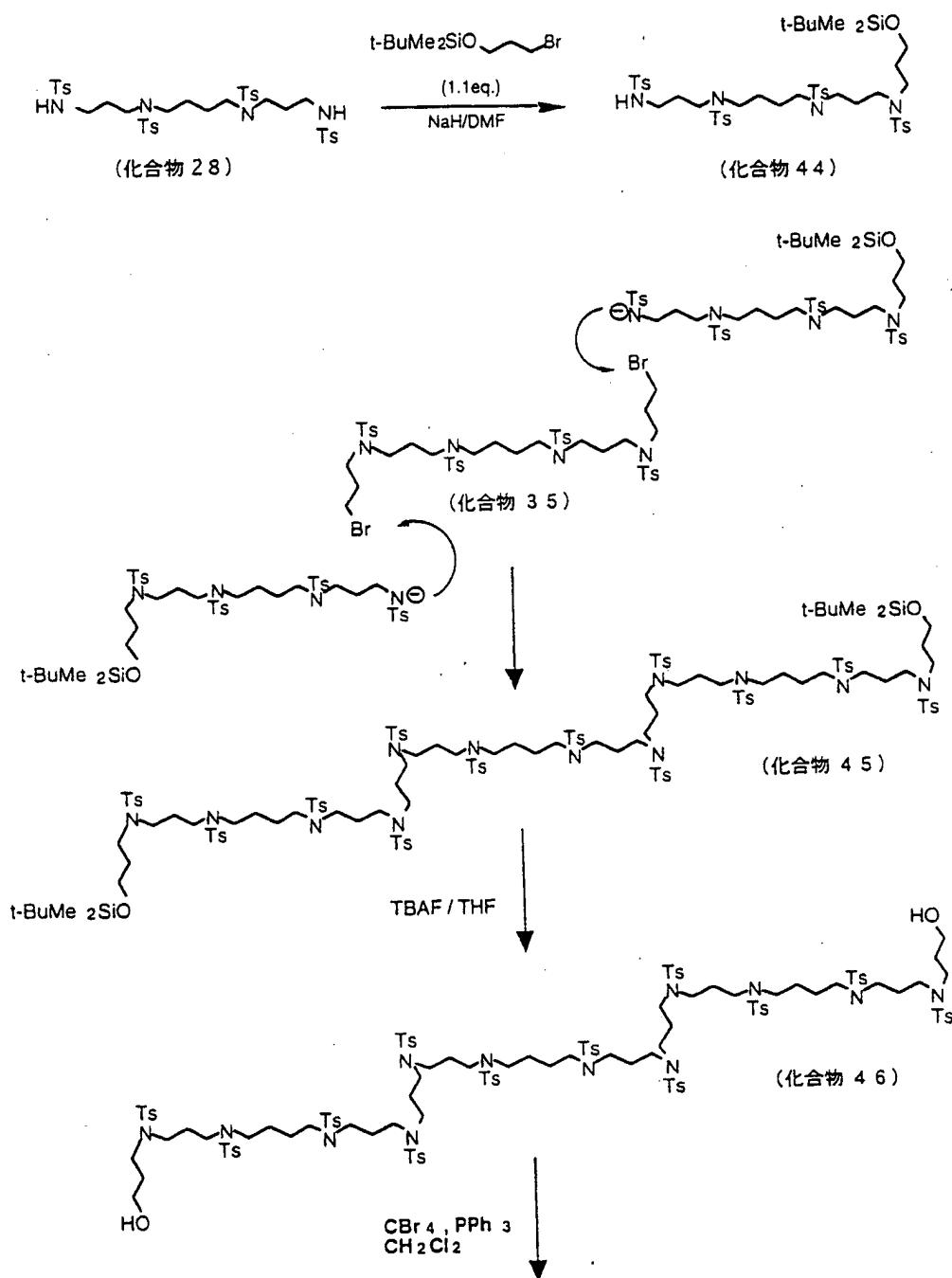
13/16

図 13



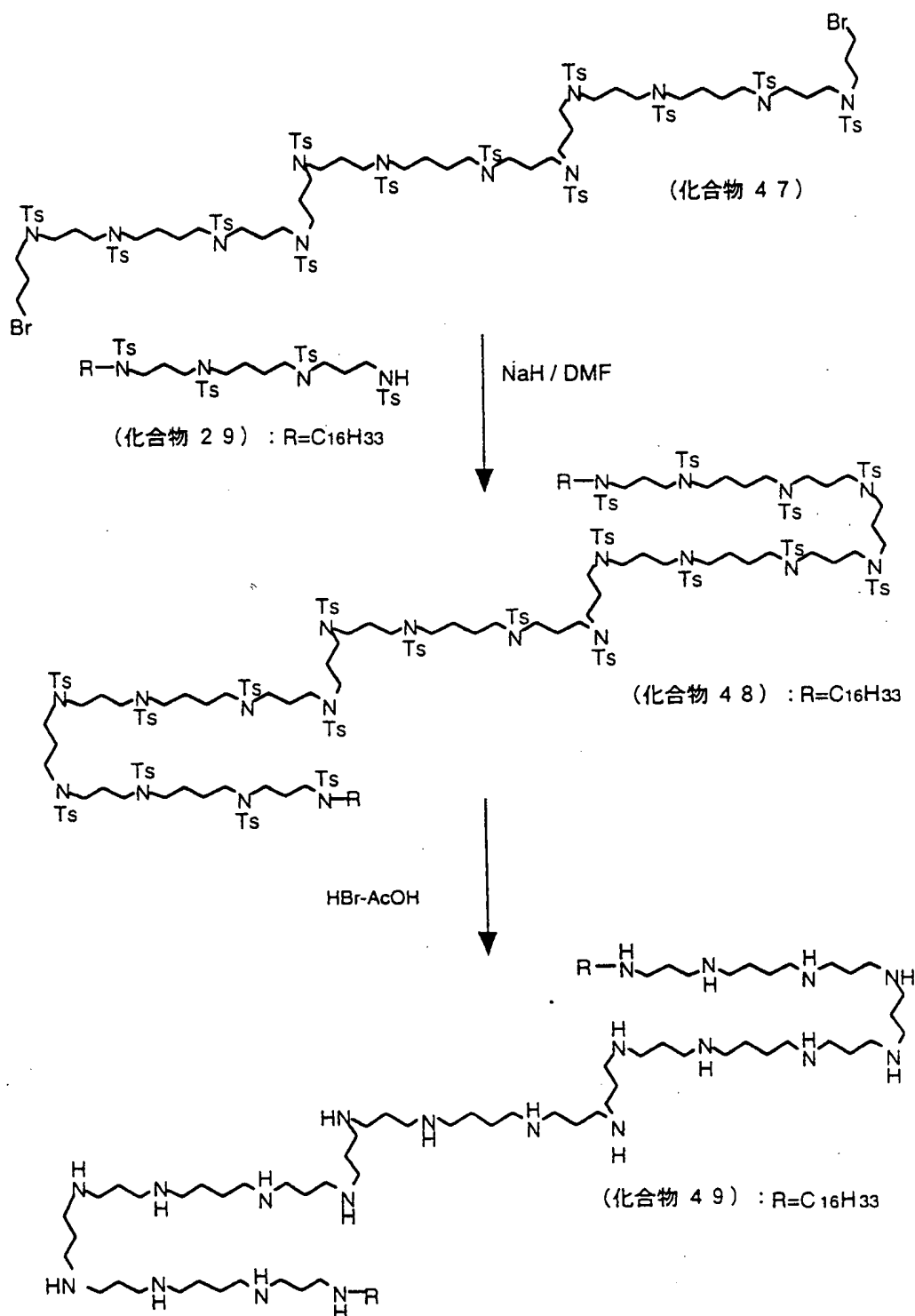
14/16

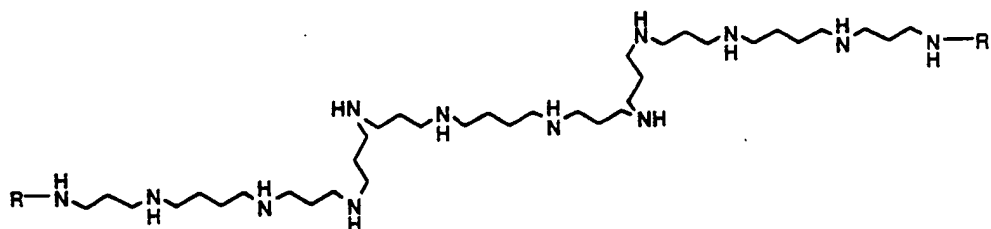
図 14



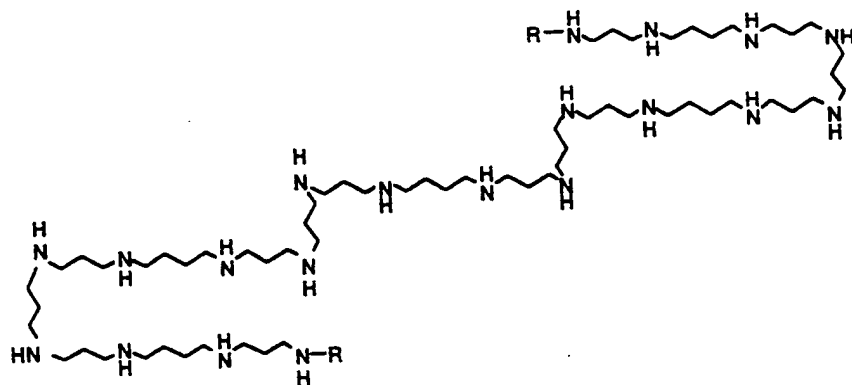
15 / 16

図 15





化合物名	化合物番号	R
TSL-D16	40	C ₁₆ H ₃₃ (Cetyl)
TSL-D12	41	C ₁₂ H ₂₅ (Lauryl)
TSL-D8	42	C ₈ H ₁₇ (Octyl)
TSL-D4	43	C ₄ H ₉ (Butyl)



化合物名	化合物番号	R
PSL-D16	49	C ₁₆ H ₃₃ (Cetyl)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00954

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48 // C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48 // C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	KHMELNITSKY, Y.L., et al., "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents", paragraph "MATERIALS AND METHODS", Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3 (1992), p.737-745	1-2 3-17 18-25
A	ZANTA, M.A., et al., "In Vitro Gene Delivery to Hepatocytes with Galactosylated Polyethylenimine", Bioconjugate Chem., Vol. 8, No. 6 (1997), p.839-844	1-25
Y A	JP, 43-8828, B (The Dow Chemical Co.), 8 April, 1968 (08. 04. 68) (Family: none)	3-17 1-2, 18-25
Y A	JP, 52-10400, A (Institut Neftekhimicheskogo Sinteza Imeni A.V. Toncheva Akademii Nauk SSSR), 26 January, 1977 (26. 01. 77) & GB, 1459809, A & DE, 2530042, A & US, 4032480, A	3-17 1-2, 18-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20 April, 1999 (20. 04. 99)

Date of mailing of the international search report
11 May, 1999 (11. 05. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00954

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP, 59-86626, A (Institut Neftekhimicheskogo Sint za Imeni A.V. Toncheva Akademii Nauk SSSR), 18 May, 1984 (18. 05. 84) & DE, 3237663, A & GB, 2128625, A & US, 4467115, A	3-17 1-2, 18-25

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48//
C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C08L79/02, A61K45/00, A61K48/00, A61K47/48//
C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	KHMELNITSKY, Y. L., et al. "Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents", paragraph "MATERIALS AND METHODS", Eur. J. Biochem., Vol. 206, No. 3 (1992), p. 737-745	1 - 2 3 - 17 18 - 25
A	ZANTA, M. A., et al. "In Vitro Gene Delivery to Hepatocytes with Galactosylated Polyethylenimine", Bioconjugate Chem., Vol. 8, No. 6 (1997), p. 839-844	1 - 25
Y A	JP, 43-8828, B (ザ・ダウ・ケミカル・コンパニー), 8. 4月. 1968 (08. 04. 68) (ファミリーなし)	3 - 17 1 - 2, 18 - 25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 04. 99

国際調査報告の発送日

11.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高

4J

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 6833

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	J P, 52-10400, A (インスティテュート ネフテキミチ エスコゴ シンテザ イメニ エイ. ヴィ. トプチュヴァ アカデ ミイ ナウク エスエスエスアール), 26. 1月. 1977 (2 6. 01. 77) &GB, 1459809, A&DE, 25300 42, A&US, 4032480, A	3-17 1-2, 18-25
Y A	J P, 59-86626, A (インステイチュト・ネフテキミチエ スコゴ・シンテザ・イメニ・エー・ブイ・トプチエバ・アカデミー ・ナウク・エスエスエスアール), 18. 5月. 1984 (18. 05. 84) &DE, 3237663, A&GB, 212862 5, A&US, 4467115, A	3-17 1-2, 18-25

PCT

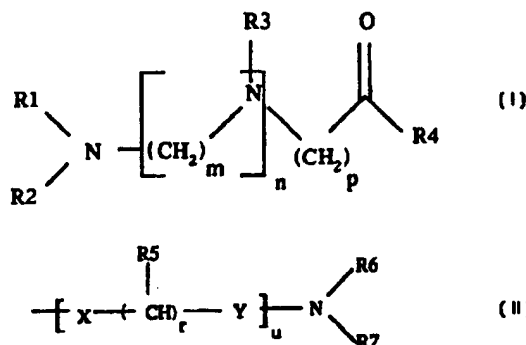
ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07C 237/06, C07K 5/06, A61K 47/48, C12N 15/87, 15/88, A61K 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/18185 (43) Date de publication internationale: 22 mai 1997 (22.05.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01774 (22) Date de dépôt international: 8 novembre 1996 (08.11.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/13490 14 novembre 1995 (14.11.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BYK, Gérardo [IL/FR]; 3, impasse Eugène-Delacroix, F-94000 Créteil (FR). SCHERMAN, Daniel [FR/FR]; 10, rue Erard, F-75012 Paris (FR). SCHWARTZ, Bertrand [FR/FR]; 13-15, rue Paul-Bert, F-94700 Maisons-Alfort (FR). DUBERTRET, Catherine [FR/FR]; 14, rue des Bruyères, F-92310 Sèvres (FR). (74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).	(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	

(54) Title: LIPOPOLYAMINES AS TRANSFECTION AGENTS AND PHARMACEUTICAL USES THEREOF**(54) Titre:** LIPOPOLYMAMINES COMME AGENTS DE TRANSFECTION ET LEURS APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES**(57) Abstract**

Lipopolyamines of formula (I), wherein each of R1, R2 and R3, which are the same or different, is a hydrogen atom or a -(CH₂)_q-NRR' grouping, where q is independently 1, 2, 3, 4, 5 or 6 for each of the groupings R1, R2 and R3; each of m, n and p, which are the same or different, is an integer from 0 to 6; and R4 is a grouping of general formula (II), wherein each of R6 and R7, which are the same or different, is a hydrogen atom or a saturated or unsaturated C10-22 aliphatic radical, with the proviso that at least one of the two groupings is not hydrogen, u is an integer from 0 to 10, X is an oxygen or sulphur atom or an optionally monoalkylated amine grouping, Y is a carbonyl or methylene grouping, R5 is a hydrogen atom or an optionally substituted natural amino acid side chain, and r is an integer from 1 to 10, with the proviso that when r is 1, R5 is an optionally substituted natural amino acid side chain, and when r is more than 1, R5 is a hydrogen atom, are disclosed. Pharmaceutical compositions containing said lipopolyamines, and the use thereof for *in vitro* or *in vivo* nucleic acid transfection in cells, are also disclosed.

**(57) Abrégé**

La présente invention se rapporte à des lipopolyamines de formule (I) dans laquelle R1, R2 et R3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement -(CH₂)_q-NRR', q pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R1, R2 et R3; m, n et p représentent, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier pouvant varier entre 0 et 6; R4 représente un groupement de formule générale (II) dans laquelle R6 et R7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique, saturé ou non, en C10 à C22 avec au moins l'un des deux groupements étant différent de l'hydrogène; u est un nombre entier choisi entre 0 et 10; X représente un atome d'oxygène, de soufre ou un groupement amine monoalkylé ou non; Y représente un groupement carbonyle ou un groupement méthylène; R5 représente un atome d'hydrogène ou une chaîne latérale d'acide amine naturel, le cas échéant substituée et r représente un entier variant entre 1 et 10 avec lorsque r est égal à 1, R5 représentant une chaîne latérale d'acide aminé naturel substitué ou non et lorsque r est supérieur à 1, R5 représentant un atome d'hydrogène. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques les contenant et leurs applications pour la transfection d'acides nucléiques, *in vitro* ou *in vivo* dans des cellules.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Bésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

LIPOPOLYAMINES COMME AGENTS DE TRANSFECTION ET LEURS APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES

La présente invention concerne de nouveaux composés apparentés à la famille des lipopolyamines, des compositions pharmaceutiques les contenant, leurs
5 applications pour la transfection in vivo et/ou in vitro d'acides nucléiques et leur procédé de préparation.

De nombreuses maladies génétiques sont associées à un défaut d'expression et/ou une expression anormale, c'est à dire déficiente ou excessive, d'un ou plusieurs acides nucléiques. La thérapie génique a pour principal objectif de corriger ce type
10 d'anomalies génétiques par le biais de l'expression cellulaire in vivo ou in vitro de gènes clonés.

Aujourd'hui, plusieurs méthodes sont proposées pour la délivrance intracellulaire de ce type d'information génétique. L'une d'entre elles, en particulier, repose sur l'emploi de vecteurs chimiques ou biochimiques. Les vecteurs synthétiques
15 ont deux fonctions principales, compacter l'ADN à transfecter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, à travers les deux membranes nucléaires.

Un progrès important a été accompli dans ce mode de transfection avec le développement d'une technologie basée sur l'emploi d'un lipide cationique. Il a ainsi été
20 mis en évidence qu'un lipide cationique chargé positivement, le chlorure de N-[1-(2,3-diolexyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA), interférait, sous la forme de liposomes ou de petites vésicules, spontanément avec de l'ADN, qui est chargé négativement, pour former des complexes lipides-ADN, capables de fusionner avec les membranes cellulaires, et permettait ainsi la délivrance intracellulaire de l'ADN.
25 Toutefois, bien que cette molécule soit efficace au niveau de la transfection, elle présente le désavantage d'être non biodégradable et de posséder un caractère toxique à l'égard des cellules.

Depuis le DOTMA, d'autres lipides cationiques ont été développés sur ce modèle de structure : groupe lipophile associé à un groupement amino via un bras dit
30 "spacer". Parmi ceux-ci, on peut plus particulièrement citer ceux comprenant à titre de groupement lipophile deux acides gras ou un dérivé du cholestérol, et comportant, en outre, le cas échéant, à titre de groupement amino, un groupement d'ammonium

quaternaire. Les DOTAP, DOBT ou le ChOTB peuvent notamment être cités à titre représentatifs de cette catégorie de lipides cationiques. D'autres composés, comme les DOSC et ChOSC, se caractérisent par la présence d'un groupement choline à la place du groupement d'ammonium quaternaire. En général, l'activité transfectante de ces composés demeure toutefois assez faible.

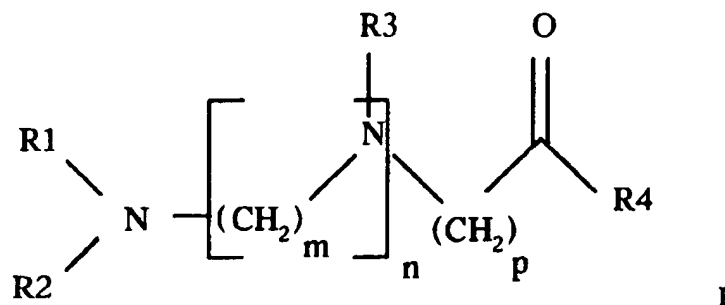
Une autre catégorie de lipides cationiques, les lipopolyamines, a également été décrite. Au sens de la présente invention, le terme lipopolyamine désigne une molécule amphiphile comprenant au moins une région hydrophile polyamine associée par une région dite spacer à une région lipophile. La région polyamine des lipopolyamines, chargée cationiquement, est capable de s'associer de manière réversible avec l'acide nucléique, chargé négativement. Cette interaction compacte fortement l'acide nucléique. La région lipophile rend cette interaction ionique insensible au milieu externe, en recouvrant la particule nucléolipidique formée d'une pellicule lipidique. Dans ce type de composés, le groupement cationique peut être représenté par le radical L-5carboxyspermine qui contient quatre groupements d'ammonium, deux primaires et deux secondaires. Les DOGS et DPPES en font notamment partie. Ces lipopolyamines sont tout particulièrement efficaces pour la transfection de cellules endocrines primaires.

En fait, un agent de transfection synthétique idéal devrait présenter un haut niveau de transfection, et ce pour un large spectre de cellules, posséder une toxicité nulle ou à défaut une toxicité très minimisée aux doses d'utilisation, et enfin, être biodégradable pour s'affranchir de tout effet secondaire au niveau des cellules traitées.

La présente invention a précisément pour objet de proposer de nouvelles lipopolyamines, originales de par leur fraction polyamine, et qui soient susceptibles d'être utilisés efficacement dans la transfection in vitro et ou in vivo de cellules et notamment pour la vectorisation d'acides nucléiques.

La présente invention a pour premier objet des lipopolyamines, sous forme D, L ou LD et leurs sels caractérisées en ce qu'elles sont représentées par la formule générale I

3



Dans laquelle :

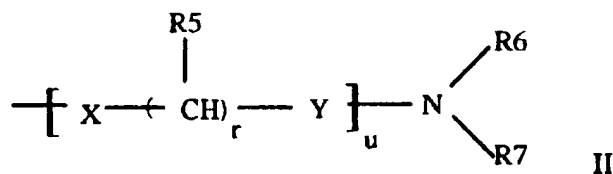
R1, R2 et R3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement $-(\text{CH}_2)_q\text{-NRR}'$ avec

- 5 q pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R1, R2 et R3 et

R et R' représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement $-(\text{CH}_2)_{q'}\text{-NH}_2$, q' pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R et R',

- 10 m, n et p représentent, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier pouvant varier entre 0 et 6 avec lorsque n est supérieur à 1, m pouvant prendre des valeurs différentes et R3 des significations différentes au sein de la formule générale I et

R4 représente un groupement de formule générale II



- 15 dans laquelle:

R6 et R7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique, saturé ou non, en C10 à C22 avec au moins l'un des deux groupements étant différent de l'hydrogène,

u est un nombre entier choisi entre 0 et 10 avec lorsque u est un entier supérieur à 1 R5, X, Y et r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents motifs [X-(CHR5)_r-Y]

5 X représente un atome d'oxygène, de soufre ou un groupement amine monoalkylé ou non,

Y représente un groupement carbonyle ou un groupement méthylène

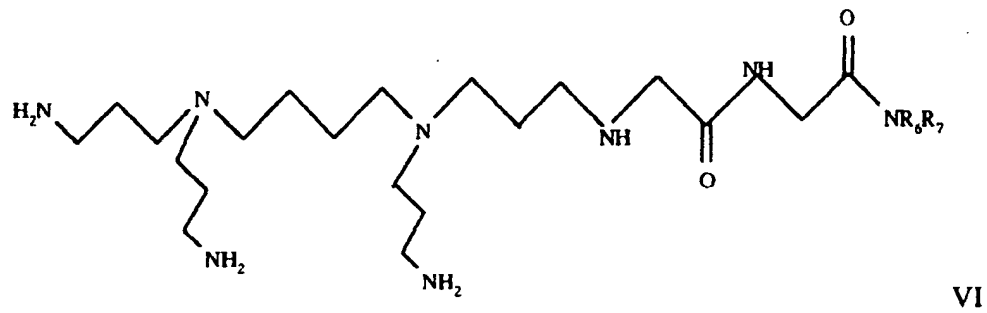
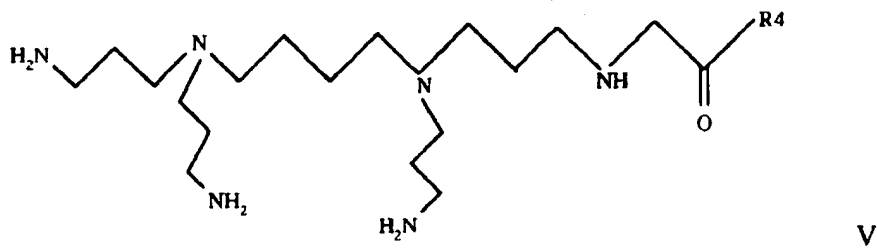
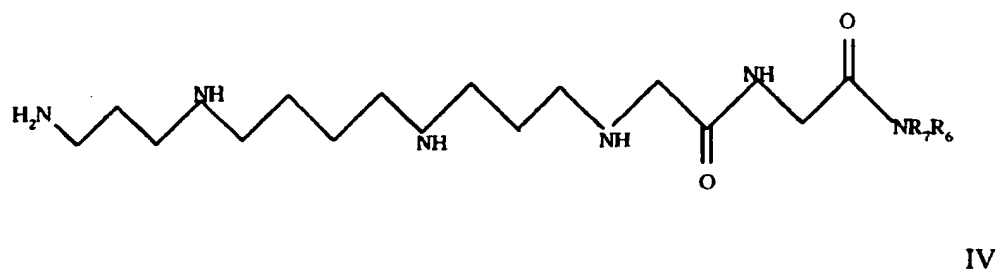
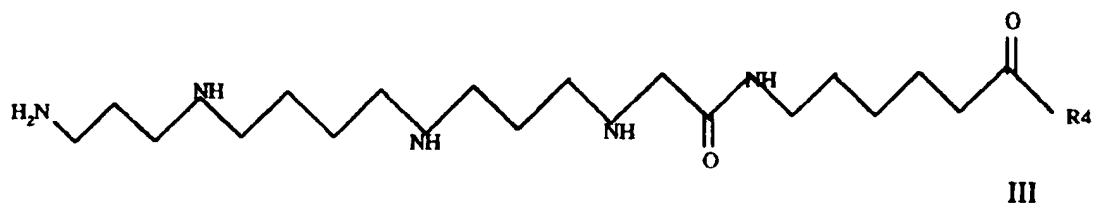
R5 représente un atome d'hydrogène ou une chaîne latérale d'acide aminé naturel, le cas échéant substituée et

10 r représente un entier variant entre 1 et 10 avec lorsque r est égal à 1, R5 représentant une chaîne latérale d'acide aminé naturel et lorsque r est supérieur à 1, R5 représentant un atome d'hydrogène.

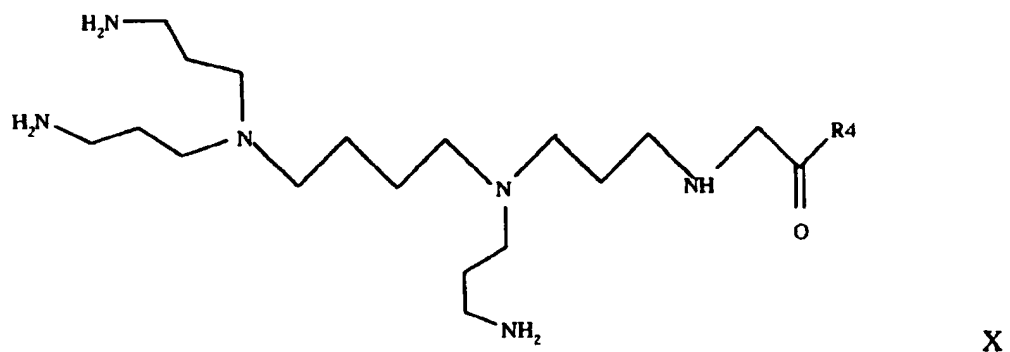
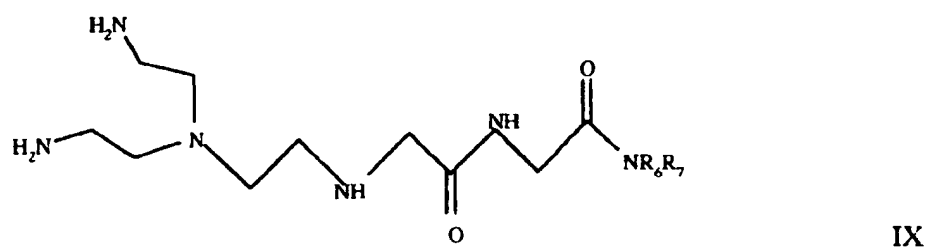
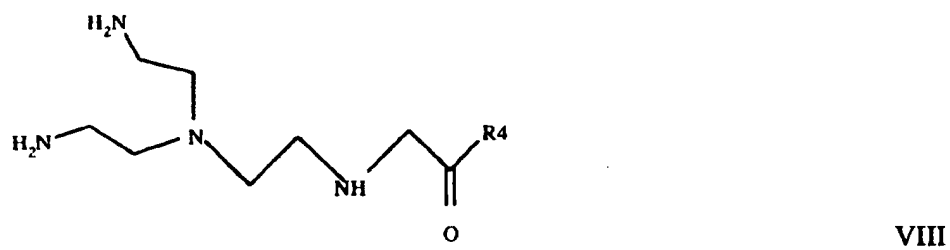
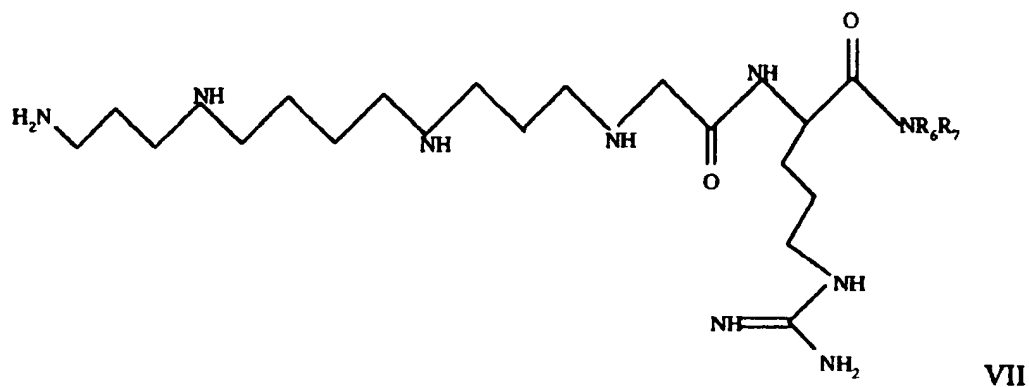
15 A titre de chaîne latérale d'acide aminé naturel on entend notamment désigné au sens de l'invention des chaînes contenant des motifs amidinium comme par exemple la chaîne latérale de l'arginine. Comme il l'est énoncé précédemment cette chaîne peut être substituée par des groupements aliphatiques saturés ou insaturés, linéaires, ramifiés ou cycliques en C1 à C24 tels par exemple des radicaux cholestéryle, arachidonyle ou rétinoyle, des groupements mono- ou poly-aromatiques tels par exemple des dérivés benzyloxycarbonyles, benzyle esters, rhodaminyle substitués ou non.

20 Ces nouveaux produits de formule générale (I) peuvent se présenter sous forme de sels non toxiques et pharmaceutiquement acceptables. Ces sels non toxiques comprennent les sels avec les acides minéraux (acides chlorhydrique, sulfurique, bromhydrique, phosphorique, nitrique) ou avec les acides organiques (acides acétique, propionique, succinique, maléique, hydroxymaléique, benzoïque, 25 fumarique, méthanesulfonique ou oxalique) ou avec les bases minérales (soude, potasse, lithine, chaux) ou organiques (amines tertiaires comme la triéthylamine, la pipéridine, la benzylamine).

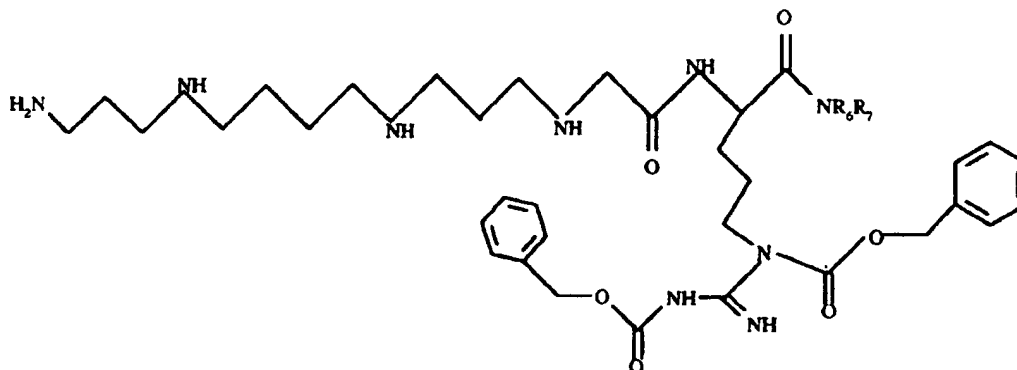
A titre représentatif des composés selon l'invention on peut plus particulièrement citer les composés de sous-formules générales suivantes:



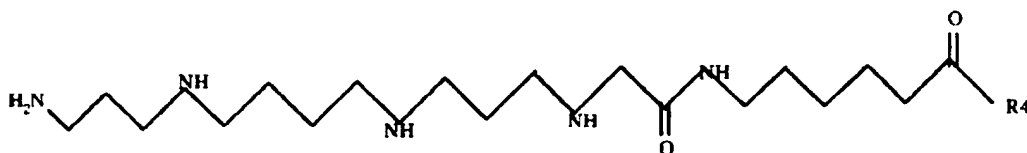
6



7



XI



XII

dans lesquelles R4, R6 et R7 possèdent les définitions précédentes. Préférentiellement, R4 y représente un groupement NR₆R₇ avec R6 et R7 figurant dans les sous formules III à XII un groupement identique choisi parmi (CH₂)₁₇ CH₃, (CH₂)₁₁ CH₃, (CH₂)₁₃ CH₃ ou (CH₂)₁₂ CH₃.

10

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, les composés revendiqués comprennent en outre un élément de ciblage permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique auquel ils sont associés. Cet élément de ciblage est de préférence incorporer, sur le composé de formule générale I, au niveau de la chaîne latérale d'acide aminé figurée par le substituant R5. Plus préférentiellement, l'élément de ciblage est lié, de manière covalente ou non covalente, au composé selon l'invention.

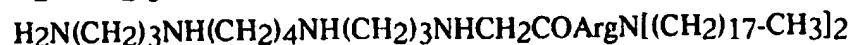
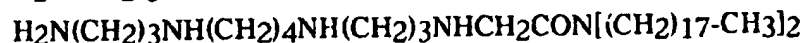
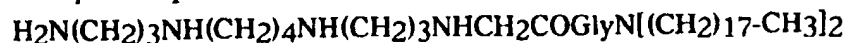
Il peut s'agir d'un élément de ciblage extracellulaire, permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus souhaités

(cellules tumorales, cellules hépatiques, cellules hématopoïétiques, etc). A ce titre, il peut s'agir d'un ligand de récepteur cellulaire présent à la surface du type cellulaire ciblé comme par exemple un sucre, un folate, une transferrine, une insuline, une protéine asialo-orosomucoïde ou toute molécule bioactive reconnue par des récepteurs
 5 extracellulaires. Il peut également s'agir d'un élément de ciblage intracellulaire, permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains compartiments cellulaires privilégiés (mitochondries, noyau, etc) comme par exemple, une séquence signal de localisation nucléaire, (nls), qui privilégie l'accumulation de l'ADN transfecté au sein du noyau.

10 Plus généralement, les éléments de ciblage susceptibles d'être mis en oeuvre dans le cadre de l'invention incluent les sucres, les peptides, les oligonucléotides, les stéroïdes ou les lipides. Préférentiellement, il s'agit de sucres et/ou peptides tels que des anticorps ou fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des récepteurs ou fragments de récepteurs, etc. En particulier, il
 15 peut s'agir de ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de lectines cellulaires ou de récepteurs de protéines d'adhésion telles que les intégrines. On peut également citer le récepteur de la transferrine, des lipides HDL et des LDL. L'élément de ciblage peut également être un sucre permettant de cibler des lectines tels que les récepteurs asialoglycoprotéiques, ou
 20 encore un fragment Fab d'anticorps permettant de cibler le récepteur du fragment Fc des immunoglobulines.

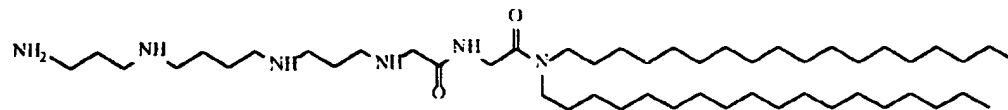
De la même façon, il est possible d'envisager l'association à un composé de formule générale I d'un agent marqueur de type biotine, rhodamine, folate par exemple sur la chaîne latérale d'acide aminé R5. Cet agent marqueur peut également être une
 25 séquence peptidique ou pseudopeptidique linéaire ou cyclique comportant l'épitope Arg-Gly-Asp de reconnaissance des récepteurs primaires et/ou secondaires des protéines d'adhésion du type intégrines.

A titre illustratif des lipopolyamines revendiquées, on peut plus
 30 particulièrement citer les composés suivants, décrits de manière plus détaillée dans les exemples ci-après:



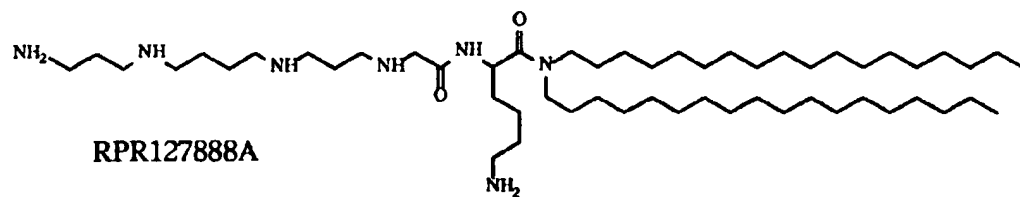
- $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArg}(\text{Z})_2\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}(\text{rhodamine})\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}(\text{biotinyl})\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{N}\{(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2\}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
5 $\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{N}\{(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2\}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]\text{CH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLysN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
10 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}[\text{Cl-Z}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}[\text{CHO}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}[\text{Cholesteryl}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}[\text{Arachidonyl}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGluN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
15 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{O-Bz}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{Galactosamide}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{Glucosamide}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{Mannosamide}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
20 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_5\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3]_2$ et
25 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3]_2$

A titre de composés particulièrement représentatifs de la présente invention on peut plus notamment citer dont la formule générale est représentée ci-après.

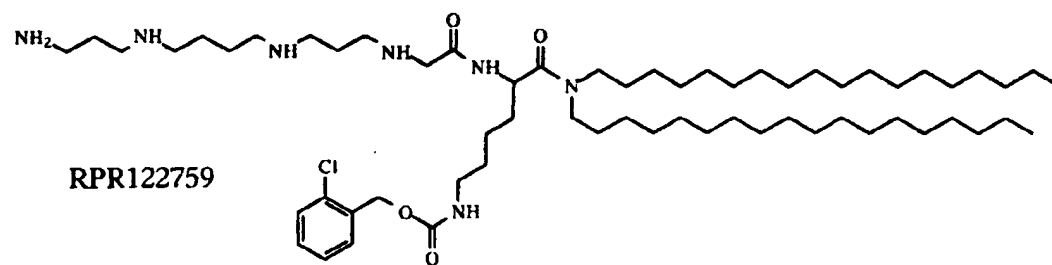


RPR120535

10



(21)

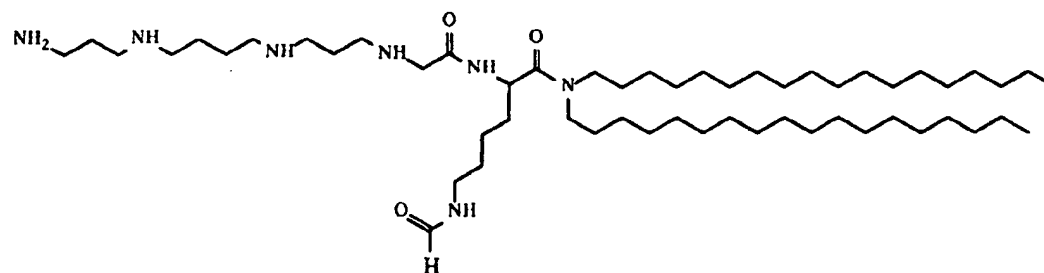


(22)

5

10

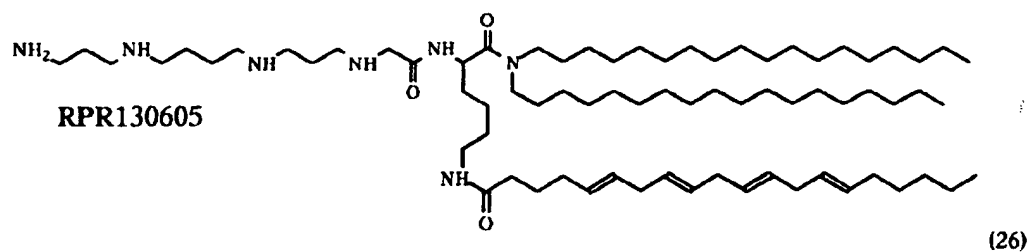
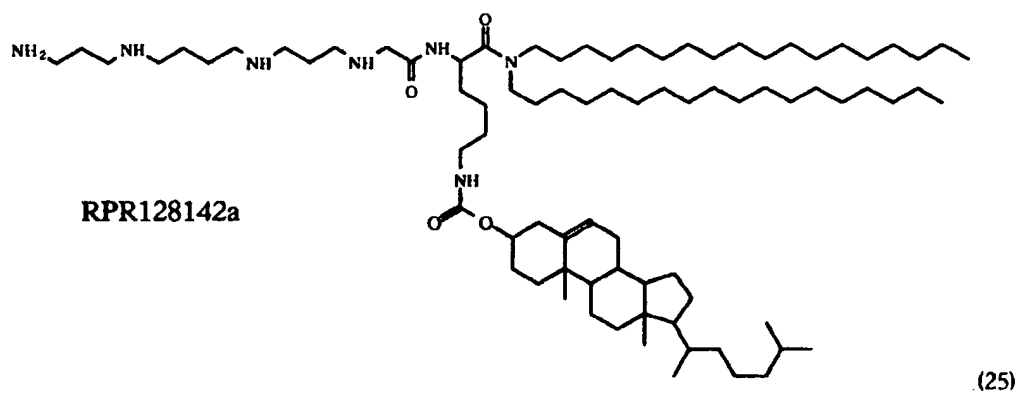
RPR 122760A



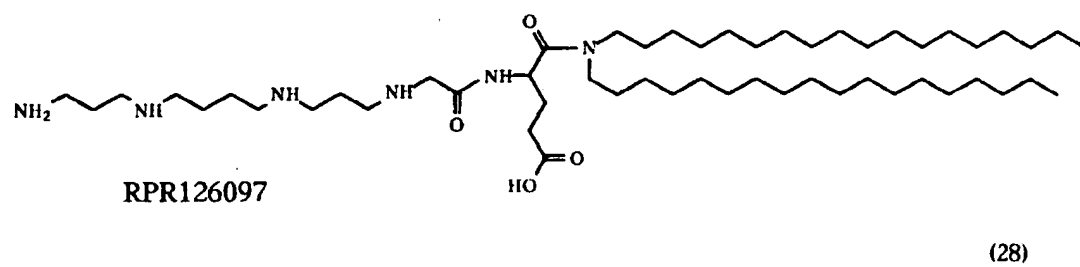
(24)

15

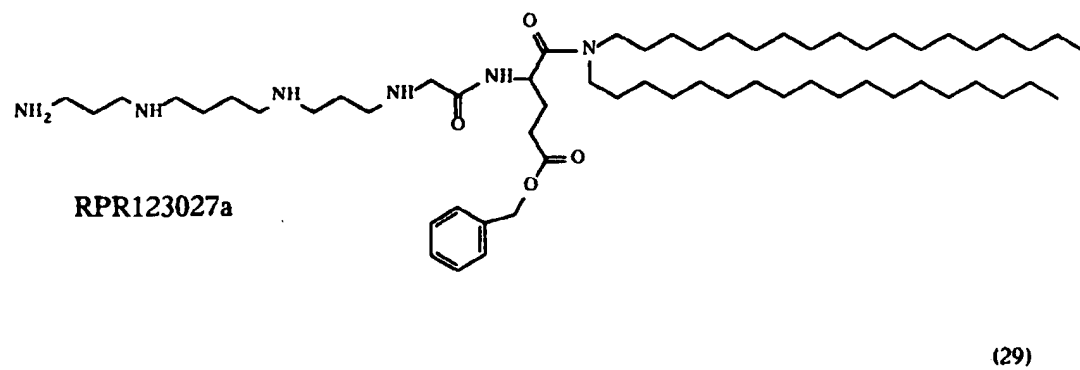
11



5

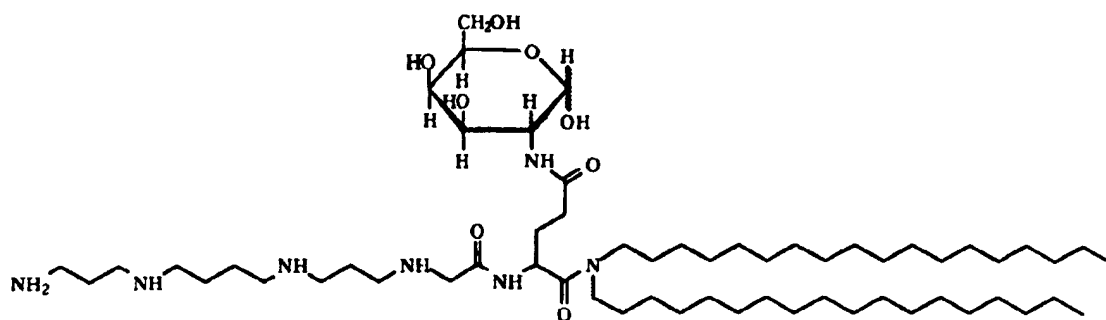


10



15

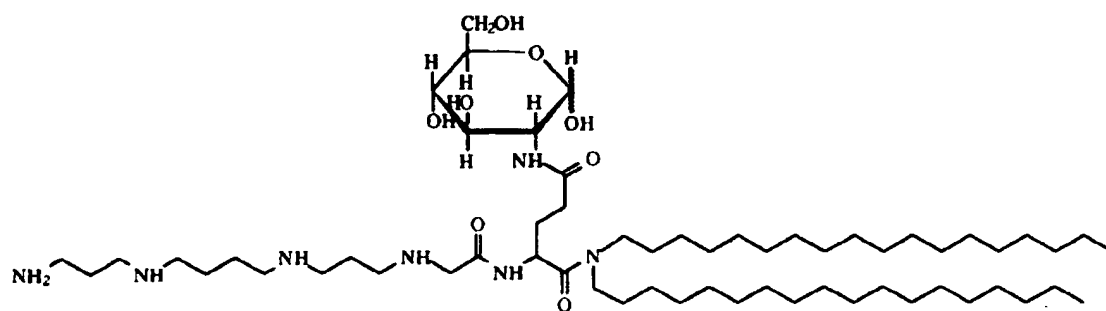
12



RPR130596a,

(31)

5

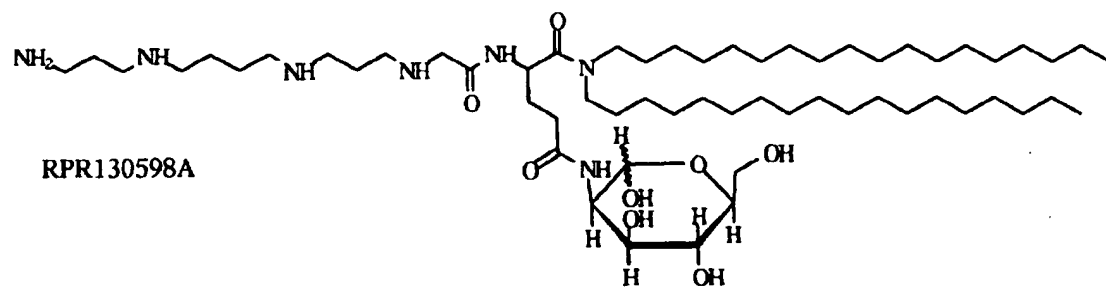


RPR130595A

(32)

10

15

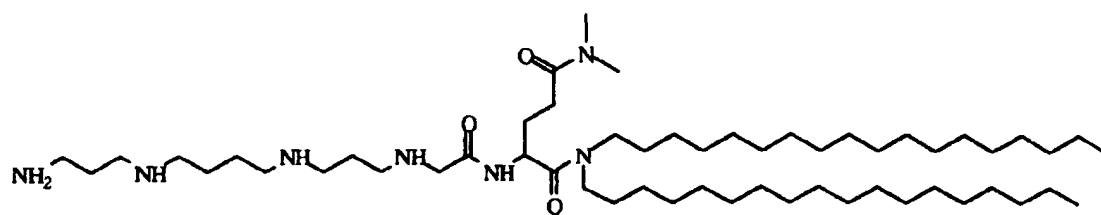


RPR130598A

(33)

20

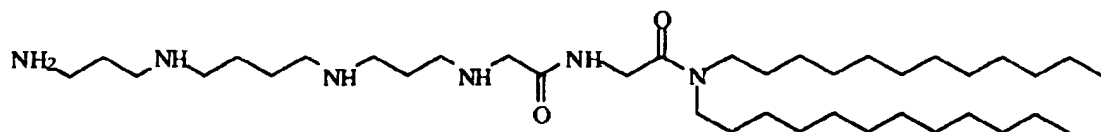
13



RPR131111a

(34)

5

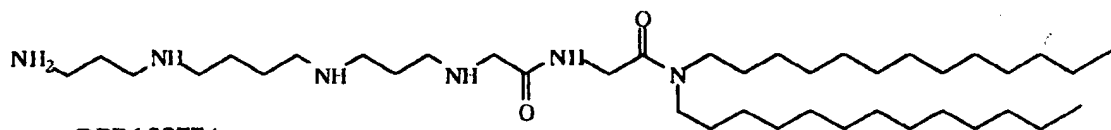


RPR122767a

(35)

10

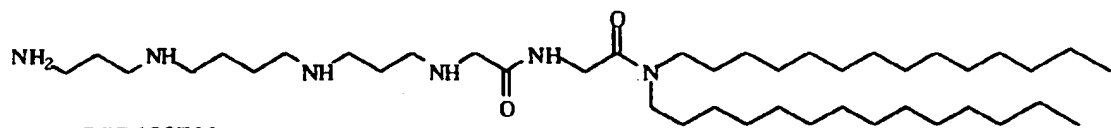
15



RPR122774a

(36)

20



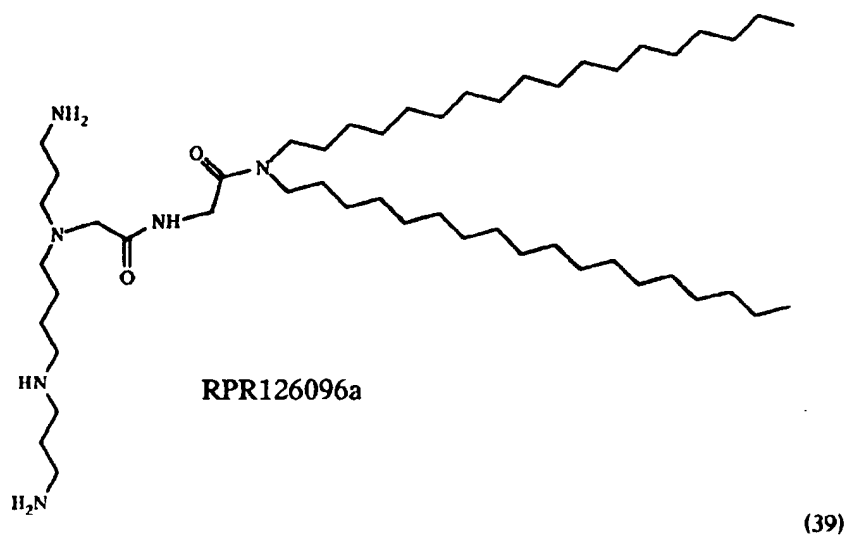
RPR122766a

(37)

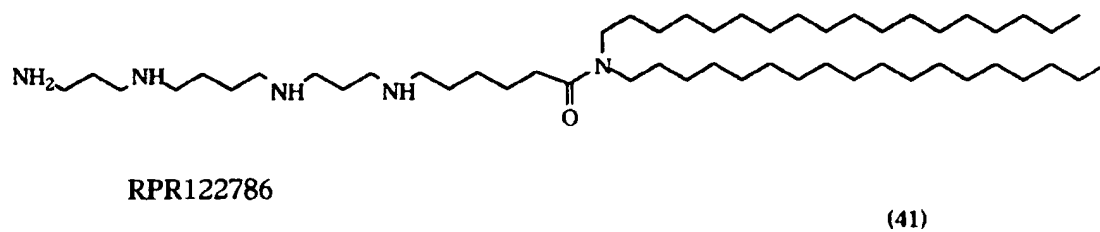
25

30

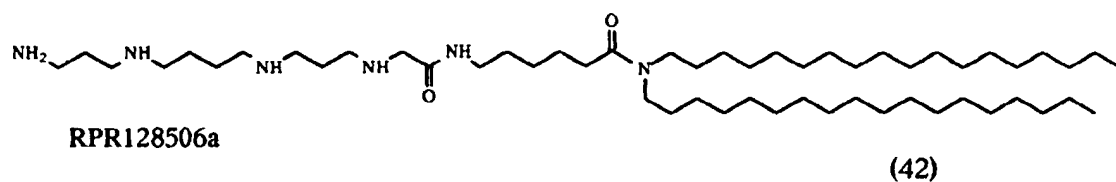
14



5



10



15

Dans le cadre de la présente invention, il a en outre été développé une méthodologie originale en phase solide pour préparer des polyamines fonctionnalisées asymétriques dont dérivent les lipopolyamines selon l'invention.

20

Classiquement, l'accès aux polyamines fonctionnalisées asymétriques est limité par la nécessité d'introduire sélectivement des modifications dans des polyamines symétriques linéaires ou branchées. Les différences chimiques entre les groupes aminés primaires et secondaires d'une polyamine requièrent une grande sélectivité pour effectuer des réactions telles que des alkylations, des additions de type Michael ou des acylations. De plus, la sélectivité imposée par de telles différences chimiques n'est pas compatible avec une alkylation sélective dans un groupe de plusieurs amines primaires et secondaires, comme on en rencontre dans les polyamines. La réponse classique à de telles restrictions est de construire les polyamines fonctionnalisées asymétriques à partir de blocs monomères portant d'un côté un groupe aminé susceptible d'être "polyaminé" et de l'autre côté la fonction asymétrique convenablement protégée. Cette approche nécessite donc une stratégie de synthèse fastidieuse en plusieurs étapes et en particulier une protection orthogonale des groupes fonctionnels.

La méthode développée dans le cadre de la présente invention, a précisément pour objectif de s'affranchir des inconvénients rencontrés jusqu'alors avec ce type de synthèse. Elle a pour net avantage de conduire commodément et rapidement à des polyamines qui sont fonctionnalisées sélectivement sur un unique groupe aminé primaire par alkylation ou alkylation réductive des polyamines symétriques.

Le principe du procédé revendiqué est fondé sur l'emploi d'une méthode de synthèse en phase solide pour favoriser une réaction bimoléculaire entre le réactif alkylant et la polyamine, ce qui évite la polyalkylation de celle-ci. Plus précisément, la présente invention se rapporte à un procédé caractérisé en ce qu'il met en oeuvre le couplage d'au moins une fraction lipidique à au moins une fraction polyamine asymétrique, ladite fraction polyamine ayant au préalable été obtenue par réaction bimoléculaire entre un agent alkylant lié covalamment à un support solide et une polyamine symétrique. Selon cette approche, le réactif alkylant est lié covalamment à un support polymère par estérification ou amidation. La polyamine symétrique réagit avec l'agent alkylant en phase solide par une réaction bimoléculaire qui mène à la polyamine asymétrique mono-fonctionnalisée attachée au support. Les amines libres du produit sont habituellement protégées en phase solide par des groupes protecteurs de type BOC ou Z, et finalement les produits sont clivés du support de phase solide. Ces acides polyaminés sont, comme il convient, couplés aux fractions lipidiques pour fournir les agents transfectants recherchés. Pour ce couplage, il est possible de mettre en oeuvre des agents de couplage peptidique usuels comme BOP, Pybop, BopCl et

DCC par exemple. La méthodologie permet également d'assembler l'agent transfectant entier sur le support solide avec l'introduction éventuelle de peptides traceurs, de sucres, ou de sondes fluorescentes dans les molécules. Bien entendu, il s'avère possible de procéder à ce type de greffage sur la lipopolyamine libre.

- 5 La faisabilité de la méthode a été démontrée par la synthèse de plusieurs acides polyaminés linéaires ou branchés asymétriques et fonctionnalisés.

- 10 La présente invention a également pour objet toute application thérapeutique des lipopolyamines telles que décrites précédemment, soit directement, soit au sein de compositions pharmaceutiques.

- 15 Comme explicité précédemment, les composés de formule générale I s'avèrent tout particulièrement intéressants pour la transfection in vitro et in vivo d'acides nucléiques. Ils compactent efficacement l'ADN et présentent avantageusement une toxicité très réduite.

- 20 Pour obtenir un effet maximal des compositions de l'invention, les proportions respectives du composé de formule générale I et de l'acide nucléique sont de préférence déterminées de manière à ce que le rapport R, charges positives de la lipopolyamine considérée par charges négatives dudit acide nucléique soit optimal. Ce rapport optimal variant en particulier selon le mode d'utilisation à savoir in vivo ou in vitro et selon le type cellulaire à transfecter, il est optimisé au cas par cas. Cette optimisation relève de la compétence de l'homme de l'art.

- 25 Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention, le polynucléotide peut être aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue
30 de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent par ailleurs être incorporés dans des vecteurs, tels que des vecteurs plasmidiques.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin de même que des oligonuléotides courts ou des séquences plus longues. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réplication, des séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc.

Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les gènes correspondant aux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, de type apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), les enzymes du métabolisme comme par exemple la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique, la lécithine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol

hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, ou encore des protéines de transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholestérol et la protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs LDL, récepteurs des chylomicrons-remnants et les récepteurs scavenger.etc.

L'acide nucléique thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncytia forming virus, d'autres virus ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences

d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

10 Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne des compositions comprenant un acide nucléique, une lipopolyamine telle que revendiquée et un adjuvant capable de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. La demanderesse a en effet montré que le pouvoir transfectant des lipopolyamines peut être de manière inattendue augmenté en présence
15 de certains adjuvants (lipides, peptides ou protéines par exemple), capables de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique.

Dans cette optique, les compositions de l'invention peuvent comprendre comme adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres. De telles compositions sont particulièrement avantageuses, notamment lorsque le rapport R est faible. La
20 demanderesse a en effet montré que l'addition d'un lipide neutre permet d'améliorer la formation des particules nucléolipidiques et, de manière surprenante, de favoriser la pénétration de la particule dans la cellule en déstabilisant sa membrane.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente invention sont des lipides à 2 chaînes grasses.

25 De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologique. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl
30 phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

Très récemment, la demanderesse a démontré qu'il était également particulièrement avantageux d'employer à titre d'adjuvant, un composé intervenant ou non directement au niveau de la condensation dudit acide nucléique (WO96/25508).

La présence d'un tel composé, au sein d'une composition transfectante à base d'une lipopolyamine, permettait de diminuer considérablement la quantité en cet agent, avec les conséquences bénéfiques qui en découlent sur le plan toxicologique, sans porter un préjudice quelconque à l'activité transfectante de ladite composition. Au contraire, celle-ci possède avantageusement un niveau de transfection supérieur.

Par composé intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique, on entend définir un composé compactant, directement ou non, l'acide nucléique. Plus précisément, ce composé peut soit agir directement au niveau de l'acide nucléique à transfecter soit intervenir au niveau d'un composé annexe qui lui est directement impliqué dans la condensation de cet acide nucléique. De préférence, il agit directement au niveau de l'acide nucléique.

Selon un mode de réalisation préféré, cet agent intervenant au niveau de la condensation de l'acides nucléique est constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10. Dans la structure du composé selon l'invention, ces motifs peuvent être répétés de manière continue ou non. C'est ainsi qu'ils peuvent être séparés par des liens de nature biochimique, par exemple un ou plusieurs acides aminés ou de nature chimique. Un tel agent peut également dériver en tout ou partie d'une histone, d'une nucléoline, d'une protamine et/ou de l'un de leurs dérivés.

Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent de 0,01 à 20 équivalents d'adjuvant pour un équivalent d'acides nucléiques en poids/poids et, plus préférentiellement, de 0,5 à 5.

Les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un

5 véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la

10 constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut

15 s'agir soit d'une injection directe dans les tissus ou les voies circulatoires, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation in vivo, par injection ou greffe.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le traitement de maladies, comprenant l'administration in vivo ou in vitro d'un

20 acide nucléique apte à corriger ladite maladie associé à un composé de formule générale I dans les conditions définies ci-avant. Plus particulièrement, cette méthode est applicable aux maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou nucléique et l'acide nucléique administré code pour ledit produit protéique ou contient ledit produit nucléique.

25 Elle s'étend à toute utilisation d'une lipopolyamine selon l'invention pour la transfection in vivo ou in vitro de cellules.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

30 FIGURES

Figure (1): Mesure de l'efficacité de transfection après traitement de cellules NIH 3T3 (cellules embryonnaires de souris - fibroblastes) par différents lipides cationiques.

Figure (2) : Mesure de l'efficacité de transfection après traitement de cellules SMC lapin (culture primaire de cellules musculaires lisses d'aorte de lapin) par différents lipides cationiques.

Figure (3) : Mesure de l'efficacité de transfection après traitement de cellules 3LL (carcinome pulmonaire de Lewis) par différents lipides cationiques.

Figure (4) : Mesure de l'efficacité de transfection après traitement de cellules NIH 3T3 (cellules embryonnaires de souris - fibroblastes) par différents lipides cationiques.

Figure (5) : Effet de la concentration en DOPE sur l'efficacité de transfection de cellules 3LL.

Figure (6) : Transfection de cellules NIH 3T3 avec des quantités variables d'ADN et un ratio nanomoles lipofectant/ μ g d'ADN constant.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

AcOEt :	Acétate d'éthyle
BOC	t-Butoxycarbonyl
BOP :	Benzotriazol-1-yloxytris (diméthylamino) phosphonium
20	hexafluorophosphate
DCC :	Dicyclohexylcarbodiimide
DCU :	Dicyclohexylurée
DMAP :	4-Diméthylaminopyridine
DMF :	Diméthylformamide
25	DMSO : Diméthyle sulfoxyde
DODA :	Diocadécylamine
EP :	Ether de pétrole
EtOH :	Ethanol
NEt ₃ :	Triéthylamine
30	Rf : Coefficient de rétention frontal
TFA :	Acide trifluoroacétique
THF :	Tétrahydrofurane
TMS :	Tétraméthylsilane
UV :	Ultra-Violets
35	SPPS: Solid Phase Peptide Synthesis
CLHP:	Chromatographie Liquide à Haute Pression
Z:	Benzyloxycarbonyl
CIZ:	p-Chlorobenzyloxycarbonyl

A- MATERIELS ET METHODES POUR LES SYNTHESES CHIMIQUES

1 MATERIEL

a) Composés

- 5 - Les polyamines de départ sont disponibles commercialement, par exemple: spermidine, spermine, tris (2-aminoéthyle) amine, phénylène-diamine, diaminoéthane (propane, butane, pentane, hexane, etc.), ou peuvent être synthétisées par des méthodes classiques, par exemple par cyanoéthylation exhaustive d'amines disponibles dans le commerce telles que les diamino-éthane (propane, butane, pentane, hexane, etc.) amine, spermidine, spermine pour donner des polyamines branchées.
- 10 - Les agents alkylants sont choisis en fonction de la méthode d'alkylation comme suit: Pour une alkylation classique: l'acide bromoacétique, les acides ω -halogéno carboxyliques.
- 15 Pour une alkylation réductive: un acide ω -aldéhyde-carboxylique, tel que l'acide glyoxalique, le semi-aldéhyde succinique, etc., ou un céto-acide tel que l'acide acéto-acétique ou l'acide pyruvique, etc.
- 20 - Les polymères utilisés sont des résines disponibles dans le commerce pour la synthèse peptidique en phase solide (synthèse de Merrifield), par exemple la résine d'O-Chlorotriyl chlorure, la résine HMP, qui fournissent des produits portant des fonctions acides libres ou une résine de type Rink. Les acides polyaminés peuvent être synthétisés directement sur un peptide présynthétisé sur la phase solide et portant une fonction bromo-alkyl ou un acide ω -aldéhyde.
- 25 - Les dioctadecylamine, triéthylamine, trifluoroacétique, BOP, DMAP, chloroformate de benzyle de chez Aldrich sont des produits commerciaux. Les solutions de NaCl et NaHCO₃ sont saturées; la solution de KHSO₄ est de 0.5 M

b) Mesures Physiques.

- Les spectres de RMN Proton ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker 400 et 600 MHz.
- 30 Les spectres de masse ont été réalisés sur un API-MS/III.

c) Techniques de chromatographie

- Les analyses CLHP sont réalisées sur un appareil Merck-Hitachi équipé d'un autosampler AS-2000A, de une pompe intelligent L-6200A et de un détecteur UV-vis
- 35 L-4000 avec longueur d'onde réglable mise à 220 nm pour séparations analytiques et à

235nm pour séparations préparatives. Les colonnes pour les séparations analytiques sont des colonnes BU-300 aquapore Butyl 7m, 300 A 300x4.6 mm. de chez Perkin-Elmer et pour les séparations préparatives des colonnes Biosil C18 HL 90-10 250x10 mm de chez Biorad. Les phases mobiles sont H₂O (0.1 % TFA) et Acétonitrile (0.1% TFA). Le débit pour les analyses analytiques est réglé à 1 ml/min et pour les préparatives à 4 ml/min.

10 Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice Merck de 0,2 mm d'épaisseur.

Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,063-0,200 mm.

Elles sont révélées soit aux UV (254nm), à la ninhydrine, en vaporisant (spray léger) une solution éthanolique de ninhydrine (40 mg / 100 ml EtOH) pour révéler les amines ou les amides en chauffant à 150°C, à la fluorescamine, en vaporisant une solution (40 mg / 100 ml Acétone) pour révéler les amines primaires ou à l' iode, en recouvrant la plaque de poudre d' iode.

20 Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,063-0,200 mm.

d) Technique de synthèse en phase solide SPPS

La synthèse en phase solide est réalisée dans un réacteur manuel de synthèse de peptides SPPS de fabrication artisanal et l'agitateur est un Flask Shaker modele A5-6021. L'évolution de couplage des polyamines à la phase solide ainsi que l'évolution de la protection des polyamines dans la SPPS est suivie par le test de Kaiser [Kaiser, E., Colescott, D.L., Bossinger, C.D. and Cook, P.I. *Anal. Biochem.* 34(2), 595 (1970)].

La resine utilisée dans les exemples pour la SPPS est la Chlorotriyl chloride Resin de 30 chez NOVABIOCHEM-Suisse.

2- MODE OPERATOIRE GENERAL

a)-Synthèse de polyamines symétriques illustrée par la préparation de la (N,N-N',N'-Tétraaminopropyl) 1-4-diamino butane:

5

Dans un ballon tricol de 2 litres, on charge 147 gr de 1-4-diamino Butane et 1000 ml d'eau déminéralisée. La solution est soumise à une agitation magnétique. Par l'intermédiaire d'une ampoule isobare on charge 443 gr d'acrylonitril en 1 heure en conservant la température à 38 C°. On monte ensuite un condensateur pour reflux et on porte la masse à 80 C° avec un bain-marie durant 1 heure. Le test fluorescamine s'avère négatif et l'excès d'acrylonitril est évaporé in vacuo à 40 C°.

10

On obtient deux phases. La phase organique inférieure est séparée, lavée par 300 ml d'eau et transvasée dans un ballon de 1000 ml. On ajoute 170 ml d'un mélange eau/méthanol (1:1 v/v). On laisse cristalliser la nuit. Le lendemain, les cristaux sont filtrés sur verre fritté de porosité 3 de 500 ml. L

15

Le gâteau est lavé sur le verre fritté avec du méthanol (2x170 ml.) et de l'éther (2x150 ml.). Le produit est séché en plateau au dessiccateur sous vide (26 mm) pendant une nuit. On obtient ainsi 461 gr du produit (rendement 93%). Le produit a été analysé par RMN et MS et les analyses sont compatibles. Le produit est hydrogéné sans autre purification.

20

Dans un autoclave inox de 1 litre on charge 30 gr du polynitrile précédent (0.1 mol). On prépare en même temps dans un becher une solution de 140 ml d'éthanol (95%) et de 8 gr de NaOH (0.2 mol). Lorsque la soude est solubilisée, on charge cette solution dans l'autoclave. De l'azote est passé dans l'autoclave et on charge 8 ml de Nickel de Raney sur charbon. L'autoclave est fermé. La pression initiale d'hydrogénation est de 52 at. et elle descend à 28.5 en 5 heures à température ambiante. La suspension est filtrée sur papier, le filtre est lavé avec de l'éthanol (2x25 ml), les filtrats sont concentrés à sec in vacuo. L'huile est mélangée avec 30 ml d'eau et extraite par 100 ml de CH₂Cl₂. La phase organique est séchée sous MgSO₄, filtrée puis évaporée in vacuo. On obtient une huile fluide jaunâtre (27 gr rendement 85 %).

25

30

Le produit a été analysé par CCM (monotache), RMN et MS et les analyses étaient compatibles. Le produit est utilisé sans autre purification.

35

b)- Méthode A: Ancrage de une fonction acide sur le support polymérique:

De la résine Chlorotriptyl chloride (5 gr. 1.2 mmol Cl/gr. resin) est chargée dans un réacteur SPPS, 50 ml de CH_2Cl_2 sont ajoutés et le mélange est agité pendant 5 mn. De l'acide bromoacétique (1.05 gr, 7 mmol) est ajouté, suivi de DIEA (0.95 ml., 7.5 mmol). Le réacteur est agité pendant deux heures à température ambiante. Le liquide est filtré et la résine est lavée avec CH_2Cl_2 et iPrOH (10x50) et MeOH (2x50ml). Enfin, la résine est séchée sous un courant d'azote.

10

c)- Méthode B : Réaction des polyamines avec la bromoacetyl-résine:

La polyamine (10 excès molaires) est dissoute dans 50 ml CH_2Cl_2 et chargée dans le réacteur contenant le produit obtenu par la méthode A. Le réacteur est agité pendant 2 hr. à température ambiante. Le solvant est filtré et la résine lavée avec CH_2Cl_2 et iPrOH (10x50 ml), le test de Kaiser est positif.

15

d)- Protection des polyamino acides sur la résine:

20

Méthode C :

Les Di-tert-butyl dicarbonate (48 mmol) et DIEA (50 mmol) sont dissous dans CH_2Cl_2 (50 ml) et chargés dans le réacteur contenant le produit obtenu selon la méthode B. Le réacteur est agité pendant une nuit. Le lendemain le test de Kaiser est négatif. Le solvant est filtré et la résine est lavée alternativement avec CH_2Cl_2 et iPrOH (10x50 ml), MeOH (2x50 ml) et éther (2x50 ml). La résine est séchée sous un courant d'azote. Le test de Kaiser est toujours négatif.

25

Méthode D :

La résine obtenue par le méthode B (1.5 gr) est chargée dans un ballon et CH_2Cl_2 (20 ml) est ajouté, suivi par DIEA (20 mmol). Le mélange est soumis à agitation magnétique et le chloroformate de benzyle (14 mmol) est ajouté goutte à goutte pendant 5 min. Le pH est maintenu à 11 par addition de DIEA. Après une nuit, la résine est passée dans un réacteur SPPS, filtrée et lavée alternativement avec CH_2Cl_2 et iPrOH (10x20 ml) et éther (2x20 ml). La résine est séchée sous un courant d'azote.

30

35

e)- Méthode E : Clivage des acides polyaminées protégées de la résine:

Les résines obtenues par les méthodes C et D sont chargées dans un ballon de 250 ml
5 équipé d'un barreau magnétique. Une solution composée de 50 ml CH_2Cl_2 et 25 ml
 $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ est ajoutée et le mélange est agité pendant 2 hr. La solution est filtrée, la
résine est lavée avec CH_2Cl_2 (2x10 ml) et les phase organiques ainsi obtenues sont
rassemblées et évaporées in vacuo. Les produits sont ensuite purifiés par flash
10 chromatographie sur SiO_2 avec comme éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1). Les fractions
contenant les produits sont identifiées par CCM. (Pour de plus amples détails voir les
exemples ci-après.)

f)- Méthode F : Couplage des acides aminées avec dilipidylamines:

15 Boc-acide amine (10 mmol) et dilipidylamine C12-C22 (10 mmol) sont chargés dans
un ballon de 250 ml. CHCl_3 (100 ml) est ajouté et le mélange est agité jusqu'à
dissolution complète. TEA (30 mmol) et BOP (33 mmol) sont ensuite ajoutés. Le pH
est maintenu à 10 avec TEA et la réaction est agitée pendant 2 hr. Après l'achèvement
de la réaction (CCM) le chloroforme est évaporé et le solide est repris dans de l'acétate
20 d'éthyle (300 ml). La phase organique est lavée avec KHSO_4 (4x100 ml), NaHCO_3
(4x100 ml), et NaCl (4x100 ml). La phase organique est séchée sous MgSO_4 filtrée et
évaporée in vacuo. Les produits sont analysés par CCM, NMR et MS et sont utilisés
sans d'autres purifications. Les rendements sont de l'ordre de 90 %.

25 **g)- Couplage des acides polyamines protégés avec dilipidyl acides amides et
clivage des groupements de protection Boc et Z**

Méthode G

Le produit obtenu par la méthode F (9 mmol) est chargé dans un ballon équipé d'un
30 barreau magnétique et du TFA froid (4 °C) est ajouté (30 ml). La solution est agitée
pendant 1 hr. Le TFA est évaporé in vacuo. Le produit est dissous par l'addition de
DMF (70 ml). On ajoute du TEA (30 mmol) puis de l'acide polyamine protégé obtenu
par la méthode E (9 mmol). Le pH est ajusté à 10 et BOP (33 mmol) est ajouté. La
solution est agitée pendant 2 hr. et suivie par CCM. Après l'achèvement du couplage
35 (CCM), une solution de KHSO_4 est ajoutée (700 ml) et le produit est extrait avec

- acétate d'éthyle (3x100 ml). La phase organique est lavée avec KHSO_4 (3x50), NaHCO_4 (3x50) et NaCl (3x50 ml), séchée sous MgSO_4 , filtrée et évaporé in vacuo. Les produits sont analysés par RMN, CCM et MS et sont déprotégés sans purification préalable. Du TFA (50 ml) est ajouté au produit et la solution est agitée pendant 1.5 hr., le TFA est évaporé. Si le produit contient encore de groupements Z ou ClZ qui sont pas clivables au TFA le méthode H est suivie directement. Les produits finaux sont purifiés par CLHP semipréparative(voir exemples).

Méthode H

- 10 Les produits obtenus par le méthode G contenant des groupe Z ou ClZ sont chargés dans un ballon équipé d'un barreau magnétique et dissous dans 10 ml MeOH/gr produit. Les Pd/C (10 %, 1gr/Gr produit) et formiate d'ammonium(1 gr/gr produit) sont ajoutés à température ambiante. L'hydrogénation est suivie par CLHP. Après 2 hr la réaction est finie, le mélange est filtré et le filtre lavé avec 10 ml MeOH. De l'eau double distillée est ajoutée et la solution est congelée et lyophilisée. Les produits finaux sont purifiés par CLHP préparative.

h) Méthode I de déprotection des groupements de protection Boc

- L'acide trifluoro acétique (50 ml) est ajouté au produit contenant des groupements Boc (1 mmol) dans un ballon. La solution est agitée pendant 1.5 hr, le TFA est évaporé. L'amine est complètement deprotégée et prête à l'emploi pour des couplages sans autre purification.

25 B-MATERIEL ET METHODE POUR L'ETUDE BIOLOGIQUE:

1 PLASMIDES UTILISES POUR LE TRANSFERT DE GENES IN VITRO

- 30 Le plasmide pCMV-LUC est une construction dérivée, soit du plasmide pGL2-Basic Vector (Promega), soit du plasmide pGL2-Control Vector (Promega) par insertion d'un fragment Mlu I-Hind III contenant le promoteur du Cytomegalovirus humain (CMV) extrait du plasmide vecteur pcDNA3 (Invitrogen).

2 PROTOCOLE DE PREPARATION DES SOLUTIONS UTILISEES POUR LA TRANSFECTION

Les produits décrits dans l'invention sont mis en solution à 20 mM dans l'éthanol ou dans l'eau, puis dilués dans l'eau en s'assurant que la concentration éthanolique finale est inférieure à 10%.

Les solutions d'acide nucléique diluées en sérum physiologique (NaCl 0,15M) sont ajoutées aux solutions de lipofectant dans un rapport 1/1 (v/v). Après homogénéisation au vortex et incubation 15 minutes à température ambiante les solutions ADN/lipofectant sont distribuées à 9% (v/v) final dans les puits où les cellules ont été lavées par du milieu de croissance dépourvu de protéines (sérum) et remises en croissance en milieu dépourvu ou non de sérum.

15 C MATERIEL POUR LES ESSAIS IN VIVO

1 MATERIELS

a) Modèles expérimentaux:

- 20 - souris C57/BL 6 adultes (>8 semaines) femelles
- tumeurs de type 3LL (Lewis Lung carcinoma) obtenues par passage de fragments de tumeur d'animal à animal, implantés sous la peau au niveau du flanc.

b) Plasmides utilisés:

- 25 pXL 2622: il dérive du pGL2 basic, (Promega) dans lequel le promoteur du cytomegalovirus (CMV) extrait de pCDNA3 (Invitrogen) a été inséré en amont du gène codant pour la luciférase. Ce plasmide est obtenu par la technique de précipitation au PEG (Ausubel), et stocké dans du Tris 10mM EDTA 1mM pH 8 à 4 °C à une concentration d'environ 10 µg d'ADN par µl.

30

2 PROTOCOLES

Solutions injectées: L'ADN à transfecter est d'abord solubilisé dans le tampon, le peptide (KTPKKAKKP)₂ SEQ ID N°1 est alors ajouté, et après 20 minutes une solution de lipides cationiques à forte concentration (20 ou 40 mM) est ajoutée au

35

mélange. Après addition de tous les produits, le mélange contient, outre l'ADN (en concentration finale de 0,5mg/ml), le peptide (0,75mg/ml) et le lipide cationique, NaCl 150mM, D-Glucose 5% et MES 5mM pH 6,2. L'injection est réalisée 20 à 30 minutes après la préparation de la solution.

5

EXEMPLE 1:

Synthèse de $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$ (6)

- 10 **a- Synthèse de l'acide {Boc-[3-(Boc-{4-[Boc-(3-Boc-amino-propyl)-amino]-butyl}amino) propyl]-amino}-acétique (3)**

La résine obtenue selon la méthode A est mise à réagir avec la spermine selon les methodes B, C et E. Le produit protégé est purifié par chromatographie sur SiO_2 . Le

15 rendement est de 40 %.

CCM: $R_f = 0.32$ ($CHCl_3/MeOH$, 9:1)

CLHP, $R_t = 4,22$ min, ($H_2O/MeCN$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

Spectre de RMN 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$ d6 avec ajout de quelques gouttes de

- 20 CD_3COOD d4, d en ppm) : 1,40 (4 s, 36H : $C(CH_3)_3$) ; 1,46 (mt, 4H : CH_2CH_2 centraux du butyle) ; 1,64 et 1,74 (2 mts, 2H chacun : CH_2 central des propyles) ; 2,96 (t, $J = 7$ Hz, 2H : CH_2NCOO) ; 3,15 (mt, 8H : CH_2NCH_2) ; 3,23 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H : CH_2NCOO) ; 3,83 (s, 2H : $CONCH_2COO$).

MH⁺: 661

25

b- Synthèse de l'acide {Z-[3-(Z-{4-[Z-(3-Z-amino-propyl)-amino]-butyl}amino) propyl]-amino}-acétique (4)

La résine obtenue selon la méthode A est mise à réagir avec de la spermine selon les methodes B, C et D. Le produit protégé est purifié par chromatographie sur SiO_2 . Le

30

CCM: $R_f = 0,85$ ($CHCl_3/MeOH$, 8:2)

CLHP, $R_t = 6.92$ min, ($H_2O/MeCN$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

- Spectre de R M N ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6, à une température de 413K, d en ppm) : 1,49 (mt, 4H : CH_2CH_2 centraux du butyle) ; 1,74 et 1,81 (2 mts, 2H chacun : CH_2 central des propyles) ; 3,07 (q, $J = 7$ Hz, 2H : CH_2NCOO benzyle) ; de 3,15 à 3,30 (mt, 8H : CH_2NCH_2) ; 3,33 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H : NCH_2COO) ; 3,70 (s, 2H : $\text{OCONCH}_2\text{COO}$) ; 5,07 - 5,10 - 5,12 et 5,13 (4 s, 2H chacun : ArCH_2OCON) ; 6,65 (mf, 1H : NHCO) ; de 7,25 à 7,40 (mt, 20H : H aromatiques).

MH^+ : 797

c- Boc-Gly-dioctadecylamide. (5)

- 10 Le Boc-Gly est couplé à la dioctadécylamine selon la methode F, rendement de 90 %

CCM: $R_f = 0.9$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1)

MH^+ = 679

- Spectre de R M N ^1H (300 MHz, CDCl_3 , d en ppm) : 0,89 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3) ; 1,29 (mt, 60H : CH_2 centraux des chaînes grasses) ; 1,49 (s, 9H : $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 1,55 (mt, 4H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 3,15 et 3,33 (2 t, $J = 7,5$ Hz, 2H chacun : NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,95 (d, $J = 5$ Hz, 2H : $\text{OCONCH}_2\text{CON}$) ; 5,57 (mf, 1H : CONH).

- 20 **d- $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{18}]_2$ (6)**

Les produits (3) et (5) ou (4) et (5) sont couplés selon la méthode G. Les produits sont déprotégés comme décrit dans la méthode G pour le produit protégé Boc et méthode H pour le produit protégé Z. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

25

CLHP, $R_t = 15.35$ min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

- BYK 2 053 Spectre de R M N ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6 avec ajout de quelques gouttes de CD_3COOD d4, à une température de 300K, d en ppm) : 0,83 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3) ; 1,23 (mt, 60H : CH_2 centraux des chaînes grasses) ; 1,43 et 1,53 (2 mts, 2H chacun : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1,63 (mt, 4H : CH_2CH_2 centraux du butyle) ; 1,96 (mt, 4H : CH_2 central des propyles) ; 2,93 - 3,00 et 3,22 (3 mts, 16H en totalité : NCH_2) ; 3,83 (s, 2H : NCH_2CON) ; 4,03 (s, 2H : CONCH_2CON).

MH^+ = 821

- 35 **EXEMPLE 2:**

Synthèse de $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2CON[(CH_2)_{18}]_2$ (7)

Le produit (3) est couplé avec la dioctadécylamine selon la méthode F et déprotégé selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions
5 analysées par CLHP.

CLHP, $R_t = 15.2$ min, ($H_2O/MeCN$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

Spectre de R M N 1H (400 MHz, dans un mélange 2/3 de CF_3COOD et 1/3 de CD_3COOD d_4 , δ en ppm) : 0,78 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3) ; 1,20 (mt, 60H : CH_2
10 centraux des chaînes grasses) ; 1,52 (mt, 4H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1,80 (mt, 4H : CH_2CH_2 centraux du butyle) ; 2,23 et 2,32 (2 mts, 2H chacun : CH_2 central des propyles) ; de 3,10 à 3,40 (3 mts, 16H en totalité : NCH_2) ; 4,15 (s, 2H : NCH_2CON).

$MH^+ = 764$

15

EXEMPLE 3:

Synthèse de $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COArgN[(CH_2)_{18}]_2$ (9)

a- Boc-Arg(Z_2)dioctadecylamide. (8)

20 Le produit est synthétisé par couplage de BocArg(Z_2) et de dioctadécylamine par la méthode F avec un rendement de 91 %

CCM $R_f = 0.9$ ($CHCl_3/MeOH$, 9:1)

$MH^+ = 1046$

25 **b- $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COArgN[(CH_2)_{18}]_2$ (9)**

Le produit (3) ou (4) est couplé au produit (8) par la méthode G et déprotégé par la méthode G (Boc) et/ou H (Z). Le produit final est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, $R_t = 13.83$ min, ($H_2O/MeCN$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

30 Spectre de R M N 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$ d_6 , δ en ppm) : 0,90 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3) ; 1,28 (mt, 60H : CH_2 des chaînes grasses) ; de 1,40 à 1,80 (mt, 12H : CH_2) ; 1,93 (mt, 4H : CH_2 central des propyles) ; de 2,80 à 3,10 (mt, 16H : NCH_2 et NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,42 (mt, 2H : CH_2N de l'amido) ; 3,77 (mt, 2H : NCH_2CON) ; 4,67 (mt, 1H : $NCHCON$) ; de 6,80 à 7,50 (mf étalé, 2H : NH_2) ; 7,78 - 7,92 - 8,80 et

9,03 (respectivement mt et 3mfs, respectivement 1H - 2H - 4H et 1H : CONH - NH et NH₂).

MH⁺: 920

5 **EXEMPLE 4:**

Synthèse de H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArg(Z)₂N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (10)

Le produit (3) est couplé au produit (8) par la méthode G et les groupes Boc clivés
10 par la même méthode. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique

CLHP, R_t= 17.75 min, (H₂O/MeCN: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

Spectre de R M N ¹ H (400 MHz, (CD₃)₂SO, d en ppm) : 0,87 (t, J = 7 Hz, 6H :
15 CH₃) ; 1,25 (mt, 60H : CH₂ centraux des chaînes grasses) ; 1,40 et 1,57 (2 mts, 2H
chacun : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,65 (mt, 8H : CH₂CH₂ centraux des
butyles) ; 1,95 (mt, 4H : CH₂ central des propyles) ; de 2,85 à 3,05 (mt, 14H en
totalité : NCH₂) ; 3,23 (t, J = 7,5 Hz, 2H : NCH₂) ; 3,75 (s, 2H : NCH₂CON) ; 3,85
et 3,95 (2 mts, 1H chacun : CH₂NC) ; 4,67 (mt, 1H : CONCHCON) ; 5,07 et 5,25
20 (respectivement AB limite et s, J = 13,5 Hz, 2H chacun : NCOOCH₂Ar) ; de 7,25 à
7,45 (mt, 10H : H aromatiques) ; 7,95 - 8,85 - 9,00 et 9,20 (4 mfs : H échangeables).

MH⁺:1188

EXEMPLE 5:

25 **Synthèse de H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(rhodamine)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (13)**

a- Boc-Lys(Z)dioctadecylamide (11)

Le produit a été synthétisé par couplage de BocLys(ClZ) avec le dioctadécylamine par
30 la méthode F avec un rendement de 89 %.

CCM, R_f= ,92 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

MH⁺: 918

b-BocHN(CH₂)₃NBoc(CH₂)₄NBoc(CH₂)₃NBocCH₂COLys(CIZ)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (12)

Le produit (3) est couplé au produit (11) par la méthode G (sans la déprotection du Boc).

Spectre de R M N ¹ H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, à une température de 423 K, d en ppm) : 0,92 (t, J = 6,5 Hz, 6H : CH₃) ; 1,32 (mt, 60H : CH₂ centraux des chaînes grasses) ; 1,44 (2 s, 36H en totalité : C (CH₃)₃) ; de 1,50 à 1,80 (mt, 16H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse - CH₂CH₂ centraux du butyle - CH₂CH₂CH₂ et CH₂ central du propyle) ; 3,00 (q, J = 6,5 Hz, 2H : OCONCH₂) ; 3,05 (q, J = 6,5 Hz, 2H : CH₂NCOO) ; de 3,15 à 3,40 (mt, 14H : NCH₂ des chaînes grasses - CH₂NCH₂ et
 10 CH₂NCH₂CH₂N) ; 3,80 (s, 2H : OCONCH₂CON) ; 4,75 (mt, 1H : CONCHCON) ; 5,15 (s, 2H : NCOOCH₂Ar) ; 5,97 et 6,53 (2 mts, 1H chacun : OCONH et NHCOO) ; 7,08 (d, J = 7,5 Hz, 1H : CONH) ; de 7,30 à 7,50 (mts, 4H : H aromatiques).

c-H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(rhodamine)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (13)

15 Le groupement CIZ sur la lysine du produit (12) est clivé par la méthode H, le produit ainsi obtenu est séché in vacuo et repris dans de l'éther et rincé avec NaHCO₃ et NaCl. L'éther est séché sur de MgSO₄ et évaporé in vacuo.

77 mg (60 µm) du produit déprotégé sont dissous dans 3 ml de MeOH, le DIEA (64 µL) est ajouté puis la tétraméthyl rhodamine isothiocyanate (30 mg, 68 µm); la
 20 solution est agitée pendant 17 hr et la réaction est suivie par CCM. Le lendemain la solution est concentrée à sec in vacuo. Le TFA (4ml) est ensuite ajouté et on laisse agiter pendant 1 hr. Le TFA est évaporé et le produit brut est purifié par CCLHP semipréparative avec un rendement final de 30 %.

CCM, R_f = 0.05 (MeOH)

25 CLHP (semiprep.) R_t = 61,55 min. (H₂O/MeCN: 3 min [100/0], 3-45 min [0/100], 45-140 min. [0/100].

MH⁺: 1335

EXEMPLE 6:

30 **Synthèse de H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(biotinyl)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (14)**

Le produit (12) est déprotégé par la méthode H (271 mg, 0,21 mmol) et dissous dans du DMF (10 ml). le DIEA (0,11ml) est ajouté puis la biotine (56,4 mg, 0,23 mmol) et
 35 le BOP (102 mg, 0,23 mmol; le pH est maintenu à 10 (DIEA) et la fin de la réaction

est vérifiée par le test fluorescamine. Le produit est récupéré comme décrit dans la méthode F et déprotégé sans autre purification avec TFA (5 ml) pendant 1 hr. Le TFA est évaporé et le produit purifié par CHLP semipréparative avec un rendement de 50 %.

- 5 **CLHP**, $R_t = 13.12$ min, (H₂O/MeCN: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])
MH⁺: 1118

EXEMPLE 7

- 10 **Synthèse de {H₂N(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂}(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (16)**

a- {BocNH(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NHBoc}(CH₂)₃NBocCH₂COOH (15)

- 15 Le produit (1) est ancré sur le polymère par la méthode B, protégé par la méthode C et clivé de la résine par la méthode E. Le produit est purifié sur SiO₂ avec un rendement de 35 %.

CCM: $R_f = 0,2$ (CHCl₃/MeOH, 8:2)

- 20 **Spectre de R M N ¹ H** (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆ avec ajout de quelques gouttes de CD₃COOD d₄, à une température de 433K, d en ppm) : 1,42 (s, 36H : C(CH₃)₃) ; 1,56 (mt, 4H : CH₂CH₂ centraux du butyle) ; de 1,65 et 1,85 (mt, 8H : CH₂ central des propyles) ; 2,76 (mt, 12H : CH₂N(CH₂)₂) ; 3,06 (t, J = 6,5 Hz, 6H : OCONCH₂) ; 3,29 (mt, 2H : NCH₂) ; 3,86 (s, 2H : OCONCH₂COO).

MH⁺ = 775

- 25 **b-{H₂N(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂}(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (16)**

Le produit (15) est couplé avec le produit (5) selon la méthode G. Le produit est déprotégé par méthode G et est purifié sur CLHP semipréparative, les fractions sont analysées par CLHP analytique et lyophilisées. Rendement de 55 %.

- 30 **CLHP** (semiprep.): $R_t = 38,72$ min (H₂O/MeCN, 10 min [100/0], 10-45 min [0/100], 45-140 min [0/100])

- Spectre de R M N ¹ H** (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, à une température de 386 K, d en ppm) : 0,90 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃) ; 1,30 (mt, 60H : CH₂ centraux des chaînes grasses) ; 1,55 (mt, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,65 (mt, 4H : CH₂CH₂ centraux du butyle) ; 1,97 (mt, 8H : CH₂ central des propyles) ; de 2,80 à 3,05 - 3,06 et 3,28 (respectivement mt et 2 t, J = 7,5 Hz, 18H - 2H et 4H : NCH₂) ; 3,80 (s, 2H :

NCH₂CON) ; 4,03 (d, J = 5,5 Hz, 2H : CONCH₂CON) ; de 6,00 à 9,00 (mf étalé : NH₂ et NH) ; 8,27 (mt, 1H : CONH).

MH⁺: 935

5 EXEMPLE 8

Synthèse de:



Il est synthétisé comme le produit (7) en utilisant le produit (15) à la place du (3). Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique et lyophilisées.

CLHP (semiprep.): R_t = 38 min (H₂O/MeCN, 10 min [100/0], 10-45 min [0/100], 45-140 min [0/100])

Spectre de R M N ¹ H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆ avec ajout de quelques gouttes de CD₃COOD d₄, d en ppm) : 0,88 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃) ; 1,29 (mt, 60H : CH₂ centraux des chaînes grasses) ; 1,52 (mt, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,68 (mt, 4H : CH₂CH₂ centraux du butyle) ; de 1,90 à 2,10 (mt, 8H : CH₂ central des propyles) ; 2,90 - de 2,95 à 3,15 - 3,18 et 3,15 (respectivement t - mt et 2 t larges, J = 7,5 Hz, 24H en totalité : NCH₂) ; 4,02 (s, 2H : NCH₂CON).

MH⁺ = 878

EXEMPLE 9

Synthèse de $\{H_2N(CH_2)_2\}_2N(CH_2)_2NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2 \quad (19)$

25 a- $\{BocNH(CH_2)_2\}_2N(CH_2)_2NBocCH_2COOH \quad (18)$

Il est synthétisé comme le produit (15) en utilisant la tris(aminoethyl)amine à la place du produit (1). Rendement 29 %.

CCM, R_f = 0,55 (CHCl₃/MeOH, 8:2)

Spectre de R M N ¹ H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆ à une température de 393 K, d en ppm) : 1,44 (s, 27H : C(CH₃)₃) ; 2,58 (t, J = 6,5 Hz, 4H : CH₂NCH₂) ; 2,66 (t, J = 7 Hz, 2H : NCH₂) ; 3,04 (q, J = 6,5 Hz, 4H : OCONCH₂) ; 3,28 (t, J = 7 Hz, 2H : OCONCH₂) ; 3,76 (s, 2H : OCONCH₂COO) ; 6,06 (mf, 2H : CONH).

MH⁺ = 505

35 b- $\{H_2N(CH_2)_2\}_2N(CH_2)_2NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2 \quad (19)$

Il est synthétisé comme le produit (17) en utilisant (18) à la place de (15) avec un rendement de 65%.

CLHP, $R_t = 122$ min, (H₂O/MeCN, 10 min[100/0], 10-45 min [0/100], 45-140 min [0/100])

- 5 Spectre de R M N ¹ H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆ avec ajout de quelques gouttes de CD₃COOD d₄, d en ppm) : 0,87 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃) ; de 1,15 à 1,35 (mt, 60H : CH₂ centraux des chaînes grasses) ; 1,45 et 1,55 (2 mts, 2H chacun : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 2,64 (t, J = 5,5 Hz, 4H : CH₂NCH₂) ; 2,75 (t, J = 6 Hz, 2H : NCH₂) ; 2,95 (t, J = 5,5 Hz, 4H : NCH₂) ; 3,08 (t, J = 6 Hz, 2H : NCH₂) ; 3,25 (mt, 4H : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,88 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,06 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH₂CON) ; 7,75 (mf étalé résiduel : NH) ; 8,68 (t résiduel, J = 5 Hz : CONH).
MH⁺ = 765

15 EXEMPLE 10

Synthèse de $\{H_2N(CH_2)_2\}_2N(CH_2)_2NHCH_2CON[(CH_2)_{17}-CH_3]_2$ (20)

Il est synthétisé comme le produit (19) en utilisant le dioctadécylamine à la place de (5). Rendement de 73 %.

- 20 CLHP, $R_t = 100,1$ min, (H₂O/MeCN, 10 min[100/0], 10-45 min [0/100], 45-140 min [0/100])
MH⁺ = 708

25 EXEMPLE 11

Synthèse de $NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COLysN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$ (21)
 (RPR 127888 A)

- 30 Le produit (12) est déprotégé par la méthode H (Cl-Z), suivie de la méthode I. Le produit final est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, $R_t = 11.76$ min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

MH⁺: 892

- 35 Spectre de R M N ¹ H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, à une température de 393K, d en ppm) : 0,91 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,31 (mt, 60H : (CH₂)₁₅

- centraux des chaînes grasses) ; de 1,35 à 1,75 (mt, 10H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse, (CH₂)₃ centraux du lysyle) ; 1,75 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 2,00 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,82 - 2,98 - 3,06 et de 3,10 à 3,50 (respectivement 2 t - mt et 2mfs, J = 7 Hz, 18H en totalité : NCH₂ du lysyle - NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,62 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,73 (q, J = 7 Hz, 1H : CONCHCON du lysyle) ; 8,18 (d, J = 7 Hz, 1H : CONH du lysyle).

EXEMPLE 12

- 10 Synthèse de NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(Cl-Z)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (22) (RPR 122759 A)

Le produit (12) est déprotégé par la méthode I. Le produit final est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

- 15 CLHP, Rt= 16.79 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺:1060
Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, à une température de 373K, d en ppm) : 0,91 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,31 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; de 1,30 à 1,75 (mt, 10H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse, (CH₂)₃ centraux du lysyle) ; 1,72 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,95 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,98 - 3,06 et de 2,90 à 3,50 (respectivement 2 mts et mf, 18H en totalité : NCH₂ du lysyle - NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,59 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,75 (q, J = 7 Hz, 1H : CONCHCON du lysyle) ; 5,16 (s, 2H : COOCH₂Ar) ; 6,85 (mf, 1H : OCONH) ; de 25 7,35 à 7,55 (mt, 5H : H Aromatiques) ; 8,15 (mf, 1H : CONH du lysyle).

EXEMPLE 13

Synthèse de

- 30 NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(CHO)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (24) (RPR 122760 A) (24).

a- NHBoc(CH₂)₃NBoc(CH₂)₄NBoc(CH₂)₃NBocCH₂COLysN[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (23)

- Le produit (12) est déprotégé par la méthode H (Cl-Z) avec rendement de 65% et
 35 utilisé sans autre purification.

CLHP, Rt= 20.82 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

b- NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(CHO)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (24)

Le produit (23) est couplé avec l'acide formique par la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=13.60 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

MH⁺: 920

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, à une température de 383K, d en ppm) : 0,92 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,31 (mt, 60H : (CH₂)₁₅

- centraux des chaînes grasses) ; de 1,35 à 1,70 (mt, 10H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse, (CH₂)₃ centraux du lysyle) ; 1,73 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,98 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; de 2,85 à 3,50 (mt, 18H : NCH₂ du lysyle - NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,62 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,75 (mt, 1H : CONCHCON du lysyle) ; 7,60 (mf, 1H : CONH) ; 8,05 (s large, 1H : CH de l'aldéhyde) ; 8,18 (mf, 1H : CONH du lysyle).

EXEMPLE 14

20 Synthèse de

NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys[Cholesteryl]N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (25)
(RPR 128142 A)

- Le produit (23) est couplé avec du cholesteryl chloroformate selon la méthode G (sans utilisation du réactif BOP). Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=21.66 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

MH⁺: 1304

- 30 Spectre de R M N ¹H (600 MHz, (CD₃)₂SO d₆, d en ppm) : 0,68 et 0,98 (2 s, 3H chacun : CH₃ en 18 et CH₃ en 19 du cholestéryle) ; 0,86 (mt, 12H : CH₃ des chaînes grasses et CH₃ en 26 et 27 du cholestéryle) ; 0,91 (d, J = 7 Hz, 3H : CH₃ en 21 du cholestéryle) ; 1,31 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; de 0,80 à 2,30 (mt, 42H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse - CH₂ en 1, 2, 4, 7, 11, 12, 15, 16, 22, 23 et 24 du cholestéryle - CH en 8, 9, 14, 17, 20 et 25 du cholestéryle - (CH₂)₃ centraux

- du lysyle et CH_2 des propyles) ; 1,65 (mt, 4H : $(\text{CH}_2)_2$ centraux du butyle) ; 2,88 et 2,96 (2 mts, 14H en totalité : NCH_2 du lysyle - NCH_2 du butyle - NCH_2 des propyles) ; de 3,20 à 3,50 (mt, 4H : NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,64 (s, 2H : NCH_2CON) ; 4,23 (mt, 1H : CH en 3 du cholestéryle) ; 4,63 (mt, 1H : CONCHCON du lysyle) ;
- 5 5,30 (mt, 1H : CH en 6 du cholestéryle) ; 6,98 (mt, 1H : NHCOO) ; 7,90 (mt, 1H : CONH du lysyle) ; 8,60 à 9,10 (mfs échangeables).

10 EXEMPLE 15

Synthèse de

$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}[\text{Arachidonyl}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$ (26)
(RPR 130605)

- 15 Le produit (23) est couplé avec de l'acide arachidonique sous courant d'azote et à l'abris de la lumière selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=20.67 min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

MH⁺: 1177

- 20 Spectre de R M N ¹H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6 avec ajout de quelques gouttes de CD_3COOD d4, à une température de 393K, d en ppm) : 0,90 (t, J = 7 Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; 0,91 (t, J = 7 Hz, 3H : CH_3 de l'arachidonyle) ; 1,31 (mt, 60H : $(\text{CH}_2)_{15}$ centraux des chaînes grasses) ; de 1,35 à 1,75 (mt, 18H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse - $(\text{CH}_2)_3$ centraux et CH_2 central de l'arachidonyle et $(\text{CH}_2)_3$ centraux
- 25 du lysyle) ; 1,75 (mt, 4H : $(\text{CH}_2)_2$ centraux du butyle) ; 2,02 (mt, 4H : CH_2 des propyles) ; 2,10 (mt, 6H : COCH_2 et les deux $=\text{CCH}_2$ de l'arachidonyle) ; 2,80 - 2,97-3,06 et de 3,10 à 3,50 (respectivement mt - t - mt et 2 mfs, J = 7 Hz, 24H en totalité : $=\text{CCH}_2\text{C}=\text{C}$ de l'arachidonyle - NCH_2 du lysyle - NCH_2 du butyle - NCH_2 des propyles et NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,62 (s, 2H : NCH_2CON) ; 4,73 (dd, J = 8 et 5 Hz, 1H
- 30 : CONCHCON du lysyle) ; 5,38 (mt, 8H : $\text{CH}=\text{CH}$ de l'arachidonyle).

EXEMPLE 16

Synthèse de $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGluN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$ (28)

- 35 (RPR 126097 A)

a- Boc-Glu(O-Bz)-dioctadécylamine (27)

Le produit est synthétisé par couplage de Boc- GLU(OBz) et de dioctadécylamine par la méthode F avec un rendement de 90 %

5 CCM Rf= 0.88 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

b- NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGluN[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (28)

Le produit (3) ou (4) est couplé au produit (27) par la méthode G, suivie de la méthode H (déprotection Cl-Z). Le produit final est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

10 CLHP, Rt= 14.64 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 893

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, à une température de 383K, d en ppm) : 0,90 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,30 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; 1,56 (mf, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; de 1,60 à 2,00 (mt, 2H : CH₂ central du glutaryle) ; 1,73 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,98 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,32 (t, J = 7 Hz, 2H : COCH₂ du glutaryle) ; 3,00 - 3,06 et 3,45 (respectivement t et 2 mts, J = 7 Hz, 16H en totalité : NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,65 (s large, 2H : NCH₂CON) ; 4,85 (mt, 1H : CONCHCON du glutaryle) ; 8,19 (s large, 1H : CONH du glutaryle).

EXEMPLE 17**25 Synthèse de**

**NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlu(O-Bz)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (29)
(RPR 123027 A)**

Le produit (3) est couplé au produit (27) et déprotégé par la méthode G (Boc). Le produit final est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

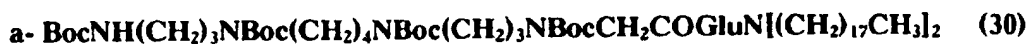
30 CLHP, Rt= 16.02 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 983

Spectre de R M N ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6, à une température de 413K, d en ppm) : 0,89 (t, J = 7 Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; 1,30 (mt, 60H : $(\text{CH}_2)_{15}$ centraux des chaînes grasses) ; 1,55 (mf, 4H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1,72 (mt, 4H : $(\text{CH}_2)_2$ centraux du butyle) ; de 1,75 à 2,00 (mt, 2H : CH_2 central du glutaryle) ; 1,99 (mt, 4H : CH_2 des propyles) ; 2,47 (t, J = 7 Hz, 2H : COCH_2 du glutaryle) ; 2,95 - 3,05 et 3,40 (3 mts, 16H en totalité : NCH_2 du butyle - NCH_2 des propyles et NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,62 (s large, 2H : NCH_2CON) ; 4,85 (mt, 1H : CONCHCON du glutaryle) ; 5,14 (AB limite, J = 12 Hz, 2H : CH_2 du benzyle) ; 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques du benzyle) ; 8,23 (mf, 1H : CONH du glutaryle).

10

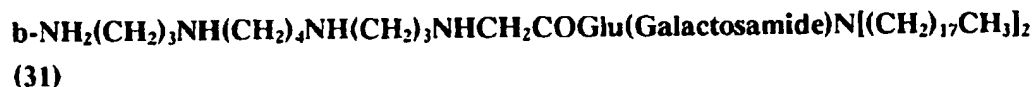
EXEMPLE 18**Synthèse de**

15 (31) (RPR 130596 A)



Le produit (3) est couplé au produit (27) et le groupe de protection OBz de la chaîne latérale est clivé par la méthode H (Cl-Z) et utilisé sans autre purification.

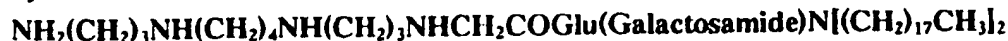
20 CLHP, Rt= 22.84 min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 1293



25 Le produit (30) est couplé avec du D(+)-Galactosamine chlorhydrate selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=13.71 min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 1054

30

EXEMPLE 19**Synthèse de**

35 (32) (RPR 130595 A)

Le produit (30) est couplé avec du D(+)-Glucosamine chlorhydrate selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

- 5 CLHP, Rt=12.27 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 1054

EXEMPLE 20

- 10 **Synthèse de**
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu(Mannosamide)N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 (33) (RPR 130598 A)

Le produit (30) est couplé avec du D(+)Mannosamine chlorhydrate selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

- 15 CLHP, Rt=12.98 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 1054

20

EXEMPLE 21

Synthèse de
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu(N(CH}_3)_2\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$ (34)
 (RPR 131111 A)

25

Le produit (30) est couplé avec de la Diméthylamine selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=14.44 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 920

- 30 Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, d en ppm) : 0,89 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,25 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; 1,43 et 1,60 (2 mts, 2H chacun : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,65 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,65 et de 1,85 à 2,00 (2 mts, 1H chacun : CH₂ central du glutaryle) ; 1,95 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,32 (AB limite, 2H : COCH₂ du glutaryle) ; 2,80 et 2,92 (2s, 3H chacun : CON(CH₃)₂) ; de 2,85 à 3,05 (mt, 12H :
- 35

NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles) ; 3,00 - 3,22 - 3,45 et 3,58 (4 mts, 1H chacun : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,78 (AB, J = 16 Hz, 2H : NCH₂CON) ; 4,75 (mt, 1H : CONCHCON du glutaryle) ; 8,72 (d, J = 7,5 Hz, 1H : CONH du glutaryle) ; 8,85 et de 8,90 à 9,15 (mfs échangeables).

5

EXEMPLE 22

Synthèse de NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₁CH₃]₂ (35)
(RPR 122767 A)

10

Synthétisé de la même manière que le produit (6), mais en utilisant de la didodecylamine à la place de dioctadecylamine. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

CLHP, Rt=9.54 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

15 MH⁺: 653

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, à une température de 403K, d en ppm) : 0,93 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,33 (mt, 36H : (CH₂)₆ centraux des chaînes grasses) ; 1,58 (mt, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,75 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,95 et 2,00 (2 mts, 2H chacun : CH₂ central des propyles) ; 2,98 et 3,00 (2 mts, 12H en totalité : NCH₂ du butyle et NCH₂ des propyles) ; 3,30 (t, J = 7Hz, 4H : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,58 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,05 (s, 2H : CONCH₂CON du glycyle).

20

25 **EXEMPLE 23**

Synthèse de NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₂CH₃]₂ (36)
(RPR 122774 A)

Synthétisé de la même manière que le produit (6), mais en utilisant de la ditridecylamine à la place de dioctadecylamine. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

30

CLHP, Rt=10.64 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

MH⁺: 681

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, à une température de 393K, d en ppm) : 0,91 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,33 (mt, 40H : (CH₂)₁₀

35

centraux des chaînes grasses) ; 1,58 (mts, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,75 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 2,00 (mt, 4H : CH₂ central des propyles) ; 2,98 et 3,08 (2 t, J = 7 Hz, 12H en totalité : NCH₂ du butyle et NCH₂ des propyles) ; 3,32 (t, J = 7 Hz, 4H : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,65 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,06 (d, J = 4 Hz, 2H : CONCH₂CON du glycyle) ; 8,60 (s large, 1H : CONH du glycyle).

EXEMPLE 24

Synthèse de NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₃CH₃]₂ (37)

10 **(RPR 122766 A)**

Synthétisé de la même manière que le produit (6), mais en utilisant de la ditetradecylamine à la place de dioctadecylamine. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

15 CLHP, Rt=9.92 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 709

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, à une température de 393K, d en ppm) : 0,90 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,31 (mt, 44H : (CH₂)₁₁ centraux des chaînes grasses) ; 1,58 (mt, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,76 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 2,00 (mt, 4H : CH₂ central des propyles) ; 2,98 et 3,08 (respectivement mt et t, J = 7 Hz, 12H en totalité : NCH₂ du butyle et NCH₂ des propyles) ; 3,30 (t, J = 7 Hz, 4H : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,65 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,06 (d, J = 4 Hz, 2H : CONCH₂CON du glycyle) ; 8,10 (mf, 1H : CONH du glycyle).

EXEMPLE 25

Synthèse NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄N[(CH₂)₃NH₂]CH₂COGlyN[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (39)

30 **(RPR 126096 A)**

a- Synthèse de BocNH(CH₂)₃NBoc(CH₂)₄N[(CH₂)₃NHBoc]CH₂CO₂H (38)

Pendant la synthèse du produit (3), on récupère lors de la purification sur SiO₂ le sous produit (38). Le rendement est de 8 %.

35 CCM Rf= 0.32 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

MH⁺: 561

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, d en ppm) : de 1.30 à 1.60 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,40 (s, 27H : C(CH₃)₃) ; 1,56 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,68 et 3,11 (respectivement t large et t, J = 7 Hz, 4H chacun : NCH₂ du butyle et NCH₂ des propyles) ; 2,90 et 2,96 (2 q, J = 7 Hz, 2H chacun : BocNHCH₂ des propyles) ; 3,18 (s, 2H : NCH₂COO).

b-NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄N[(CH₂)₃NH₂]CH₂COGlyN[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (39)

Les produits (38) et (5) sont couplés selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

CLHP, Rt=13.60 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

MH⁺: 821

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆ avec ajout de quelques gouttes de CD₃COOD d₄, d en ppm) : 0,87 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,28 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; 1,46 et 1,54 (2 mts, 2H chacun : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,63 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,91 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; de 2,85 à 3,15 (mt, 12H : NCH₂ du butyle et NCH₂ des propyles) ; 3,24 (mt, 4H : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,76 (mf, 2H : NCH₂CON) ; 4,05 (s large, 2H : CONCH₂CON du glycyle).

EXEMPLE 26

Synthèse de

NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH(CH₂)₃CON[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (41)

(RPR 122786 A)

a-BocNH(CH₂)₃NBoc(CH₂)₄NBoc(CH₂)₃NBoc(CH₂)₃CO₂H (40)

On synthétise le produit (40) en faisant une réduction alkylative sur la spermine en présence de NaCNBH₃ et de succinic semialdéhyde en solution.

Dans un ballon de 200 ml, on charge 1.8 gr de spermine, 60 ml de méthanol et 0.138 gr de NaCNBH₃. La solution est soumise à une vive agitation magnétique. Par l'intermédiaire d'une ampoule isobare on coule en 100 minutes une solution de 5.5 ml de succinic semialdéhyde (15 %) avec 30 ml de méthanol. On maintient l'agitation 100 minutes. On protège les amines par le groupe Boc de la manière suivante: on coule sur le milieu 2.8 ml de TEA puis 8.8 gr de Ditértiobutyl dicarbonate solubilisé dans 30 ml

- de Méthanol. On maintient la nuit sous agitation. Le milieu est concentré in vacuo, le produit est repris dans l'acétate d'éthyle et extrait avec trois fractions de 50 ml NaHCO_3 , les phases aqueuses sont réunies et rincées avec éther (3x100 ml). Le pH de la phase aqueuse est descendu 3 avec KHSO_4 , on apprécie une turbidité due à la
- 5 précipitation du produit 41, le mélange est extrait avec acétate d'éthyle (3x100ml). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée in vacuo. Le produit est utilisé sans autre purification.



- 10 Le produit (40) et la dioctadécylamine sont couplés selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

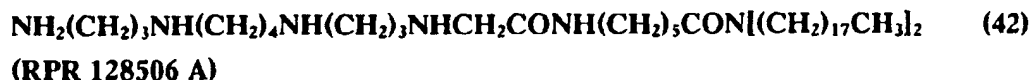
CLHP, $\text{Rt}=15.04$ min, $(\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH^+ : 792

- Spectre de R M N ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d_6 , à une température de 383K, d en ppm) : 0,85 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; 1,22 (mt, 60H : $(\text{CH}_2)_{15}$ centraux des chaînes grasses) ; 1,48 (mf, 4H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1.72 (mt, 4H : $(\text{CH}_2)_2$ centraux du butyle) ; 1,88 (mt, 2H : CH_2 central de l'aminopentanoyle) ; 1,99 (mt, 4H : CH_2 des propyles) ; 2,42 (t, $J = 7$ Hz, 2H : COCH_2 de l'aminopentanoyle) ; 2,96 - 3,03 et 3,22 (3 mts, 18H en totalité : NCH_2 de
- 20 l'aminopentanoyle - NCH_2 du butyle - NCH_2 des propyles et NCH_2 des chaînes grasses).

EXEMPLE 27

- 25 Synthèse de



- Synthétisé de la même manière que le produit (6), mais en utilisant Boc 6-aminocaproïc acide à la place de BocGly. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

CLHP, $\text{Rt}=13.94$ min, $(\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH^+ : 877

- Spectre de R M N ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d_6 , d en ppm) : 0,87 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; 1,28 (mt, 60H : $(\text{CH}_2)_{15}$ centraux des chaînes grasses) ;
- 35

- 1,48 (mt, 10H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse et (CH₂)₃ centraux de l'aminohexanoyle) ; 1,65 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,95 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,27 (t, J = 7 Hz, 2H : COCH₂ de l'aminohexanoyle) ; de 2,85 à 3,30 (mts, 18H : NCH₂ de l'aminohexanoyle - NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles et
 5 NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,70 (s large, 2H : NCH₂CON) ; de 7,90 à 9,10 (mfs échangeables).

EXEMPLE 28**10 Synthèse de**

**NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlu(11-amide-undécanyl,hepta,O
 acétyl lactose) N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (43)
 (RPR 130765 A)**

- 15 Le produit (30) est couplé avec de le 11 aminoundécanyl hepta O acétyl lactose selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=15.91 min,(H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 1680

20

EXEMPLE 29**Synthèse de**

NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COAsm(β-NAc(Ac)₃)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂

- 25 **(RPR 131283 A) (45)**

a- Fmoc-Asm-β-Glc-NAc(Ac)₃-dioctadécylamine (44)

Le produit est synthétisé par couplage de Fmoc-Asm-β-Glc-NAc(Ac)₃-OH et de dioctadécylamine par la méthode F

- 30 CCM Rf= 0.67 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

CLHP, Rt=25.31 min,(H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

35

**b-NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂CO Asm (β-NAc(Ac)₃)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂
(45)**

Clivage du groupement Fmoc du produit (45).

On coule sur 0.7 gr de produit (45) 20 ml de DMF et 2 ml de Diéthylamine. Après 6 heures de maintien sous agitation le milieu est concentré in vacuo

Le produit obtenu est couplé au produit (3) selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=15.35 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

MH⁺: 1207

EXEMPLE 30

Synthèse en solution du produit (6) à grande échelle.

On synthétise le produit (6) en faisant une réduction alkylative sur la spermine en présence de NaCNBH₃ et de l'acide glyoxylique en solution.

Dans un ballon de 2 l, on charge 18.2 gr de spermine, 500 ml de méthanol et 2 gr de NaCNBH₃. La solution est soumise à une vive agitation magnétique. Par

l'intermédiaire d'une ampoule isobare on coule en 100 minutes une solution de 8.45 gr. d'acide glyoxylic dans 300 ml de méthanol. On maintient l'agitation pendant une nuit. On protège les amines par le groupe Boc de la manière suivante: on coule sur le milieu 14 ml de TEA puis 100 gr de Ditertiobutyl dicarbonate solubilisé dans 200 ml THF. On maintient la nuit sous agitation. Le milieu est concentré in vacuo, le produit est repris dans acétate d'éthyle (250 ml), rincé avec KHSO₄ (6x100 ml) puis avec une solution saturée de NaCl (3x100), séché sur MgSO₄ et évaporée in vacuo. Le produit est purifié sur colonne de silice avec pour éluant CHCl₃/MeOH (9:1). Les fractions contenant le produit sont identifiées par CCM, regroupées et évaporées in vacuo pour obtenir 10 gr. du produit (6) (rendement de 17 % pour la synthèse total).

Les analyses de CLHP analytique, spectre de masse et RMN sont identiques à celles du produit obtenue par la méthode de phase solide.

EXEMPLE 31

Influence du rapport de charge (amines/phosphates) sur l'efficacité de transfection (7)
RPR 120534A, (6) RPR 120535A et (9) RPR 120531A

Des échantillons de 1.10^5 cellules [NIH 3T3, 3LL ou SMClapin] en phase
5 exponentielle de croissance sur 2 cm^2 sont traités par des solutions lipofectant/pCMV-
LUC, présentant des rapports de charges variables, pendant 2 heures à 37°C sous 5%
 CO_2 ; chaque échantillon reçoit $2\text{ }\mu\text{g}$ d'acide nucléique. La recherche de l'expression
du gène reporter est effectuée après addition de sérum de veau foetal à 8% final suivie
d'une incubation de 40 heures dans l'étuve à CO_2 .

10 L'activité luciférase est dosée par l'émission de lumière [RLU = relative light
unit] en présence de luciférine, coenzyme A et ATP pendant 10 secondes et rapportée
à 2000 cellules traitées. Les résultats obtenus sont reportés dans les figures (1), (2) et
(3).

De l'observation de ces figures, il ressort clairement que la présence d'une
15 glycine dans le bras « spacer » entre la partie lipidique et la polyamine permet
d'obtenir une meilleure efficacité de transfection pour des ratio nanomoles lipide
cationique/ μg ADN faibles.

20 **EXEMPLE 32**

Influence du rapport de charge (amines/phosphates) sur l'efficacité de transfection (20)
RPR 120527A, (19) RPR 120528A, (17) RPR 120526A et (16) RPR 120525A

Des échantillons de 1.10^5 cellules NIH 3T3 en phase exponentielle de croissance
25 sur 2 cm^2 sont traités par des solutions lipofectant/pCMV-LUC, présentant des
rapports de charges variables, pendant 2 heures à 37°C sous 5% CO_2 ; chaque
échantillon reçoit $1\text{ }\mu\text{g}$ d'acide nucléique. La recherche de l'expression du gène
reporter est effectuée après addition de sérum de veau foetal à 8% final suivie d'une
incubation de 40 heures dans l'étuve à CO_2 .

30 L'activité luciférase est dosée dans le surnageant obtenu après lyse des cellules
par l'émission de lumière [RLU = relative light unit] pendant 10 secondes et rapportée
au mg de protéine. Les résultats obtenus sont reportés dans la figure (4). L'avantage
de la présence du résidu glycine dans le bras « spacer » est encore mis en évidence
dans cet exemple.

EXEMPLE 33

Influence de la longueur du spacer sur l'efficacité de transfection (6)
RPR 120535, (41) RPR 122786 et (42) RPR 128506.

5

Des échantillons de 1.10^5 cellules [NIH3T3 et HeLa] en phase exponentielle de croissance sur 2 cm^2 sont traitées par des mélanges lipide cationique/pCMV-Luc, présentant des concentrations variables en lipide cationique, à 37°C en atmosphère humide sous 5% CO_2 , pendant 2 heures en absence de protéines sériques. Le milieu de croissance des cellules est ensuite supplémenté par du sérum de veau foetal à 8% final et la mesure de l'expression du transgène est effectuée après 40 heures supplémentaires d'incubation dans l'étuve à CO_2 .

15 Les caractéristiques structurales des spacers sont comme suit:

N° RPR	Spacer
122786	-
120535	Gly
128506	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CO}$

20 Le tableau I suivant reportent les résultats obtenus qui sont exprimés pour les efficacités maximum obtenues avec chacun des produits étudiés.

	lipide cationique	cellules HeLa	cellules NIH3T3
expérience 1	RPR120535 (6)	$1,2.10^6 \pm 9,7.10^4$ (4)	$8,7.10^7 \pm 4,5.10^6$ (4)
	RPR122786 (41)	$2,3.10^6 \pm 1,6.10^5$ (8)	$4,6.10^7 \pm 5,0.10^6$ (8)
expérience 2	RPR120535 (6)	$2,4.10^6 \pm 3,2.10^5$ (6)	$7,2.10^7 \pm 8,3.10^6$ (6)
	RPR128506 (42)	$1,8.10^6 \pm 1,3.10^5$ (6)	$5,0.10^7 \pm 1,5.10^6$ (6)

TABLEAU I

25

Les efficacités de transfection sont données en RLU/10s./2.103 cellules traitées. Entre parenthèses sont indiqués les ratio nanomoles lipid/ μ g ADN.

Des plasmides différents ont été utilisés pour les expériences 1 et 2, à dose de 1μ g et
5 0,5 μ g ADN/1.105 cellules respectivement dans les expériences 1 et 2.

Exemple 34 :

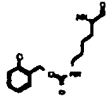
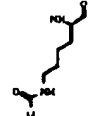
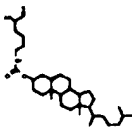
10

Influence de la structure du spacer sur l'efficacité de transfection (6) RPR 120535.

Dans des conditions d'experimentation identiques à celles décrites dans l'exemple précédent, mais avec l'introduction d'une lignée supplémentaire (cellules 3LL), nous
15 avons comparé les efficacités de transfection obtenues avec le lipide cationique (6) RPR120535 modifié par substitution sur le « spacer » avec un groupement type Arg, type Lys ou type Glu.

Les structures des différents spacers sont comme suit:

20

N° RPR	SPACER
120531	Arg
121650	Arg(Z ₂)
127888	Lys
122759	
122760	
128142	

120535	Gly
123027	GluOBz
126097	Glu

Les efficacités de transfection sont données en RLU/10s./2.103 cellules traitées.

Des plasmides différents ont été utilisés pour les expériences 1 et 2, à dose de 0,5µg
5 et 1µg ADN/1.105 cellules respectivement dans les expériences 1 et 2. De l'analyse des résultats, il ressort que selon les cellules considérées, la présence d'une chaîne d'acide aminé de préférence substituée induit une meilleur efficacité de transfection.

	lipide	Cellules HeLa	Cellules NIH3T3	Cellules 3LL
experience 1	RPR120535	$1,0.10^6 \pm 1,9.10^5$	$6,5.10^7 \pm 4,8.10^6$	
	RPR120531	$3,7.10^5 \pm 1,0.10^5$	$1,6.10^7 \pm 2,0.10^6$	
	RPR121650	$2,6.10^6 \pm 1,8.10^5$	$9,1.10^7 \pm 2,7.10^7$	
experience 2	RPR120535	$2,2.10^6 \pm 3,3.10^5$		$1,7.10^6 \pm 1,0.10^5$
	RPR127888	$3,1.10^5 \pm 2,9.10^4$		$1,4.10^5 \pm 1,7.10^4$
	RPR122760	$1,4.10^6 \pm 2,2.10^5$		
	RPR122759	$7,7.10^5 \pm 1,1.10^5$		$3,7.10^5 \pm 5,4.10^4$
	RPR128142	$6,3.10^6 \pm 6,3.10^5$		$9,1.10^4 \pm 9,3.10^3$
	RPR126097	$3,6.10^6 \pm 3,6.10^5$		$3,0.10^5 \pm 2,3.10^4$
	RPR123027	$1,0.10^6 \pm 4,1.10^4$		$6,9.10^5 \pm 1,1.10^5$

TABLEAU II

EXEMPLE 34**Influence de la présence de DOPE dans le mélange lipofectant/ADN (9) RPR 120531A**

5

Selon le même protocole que celui utilisé dans l'exemple 31 il est ajouté de la DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamine) au lipide cationique (9) RPR 120531A à des rapports molaires variables avant addition du DNA dans le mélange de transfection.

10 L'activité luciférase est dosée dans le surnageant après lyse des cellules et rapportée au mg de protéine (figure 5).

La présence de DOPE dans les mélanges lipofectants permet d'améliorer l'efficacité de transfection quand la concentration en (9) RPR 120531A est faible.

15 EXEMPLE 35**Effet du sérum sur l'efficacité de transfection (6) RPR 120535A, (9) RPR 120531A et (10) RPR 121650A**

20 Des échantillons de 1.10^5 cellules [NIH 3T3 ou Hela] en phase exponentielle de croissance sur 2 cm² sont traités par des solutions lipofectant/pCMV-LUC (3 nanomoles lipofectant/ μ g ADN) en absence de sérum pendant 2 heures ou en présence de sérum dans le milieu de culture. Dans cet exemple chaque échantillon reçoit 2 μ g d'ADN. L'expression de la luciférase est recherchée dans le surnageant des lysats cellulaires, exprimée en RLU/10s. et rapportée au mg de protéine. De l'analyse des résultats, il ressort que la présence de sérum n'a pas d'effet notable sur la transfection.

25

EXEMPLE 36**Influence de la concentration en acide nucléique dans les mélanges ADN/lipofectant (20)RPR 120527A, (19)RPR 120528A, (17) RPR 120526A et (16) RPR 120525A**

30

Dans les conditions décrites dans l'exemple 31 des échantillons de cellules NIH 3T3 sont transfectées dans des conditions où les ratios nanomoles lipofectant/ μ g d'ADN sont optimisés - voir exemple 32 - [ratio = 6 pour (20)RPR 120527A et (19)RPR 120528A - ratio = 3 pour (17)RPR 120526A et (16)RPR 120525A]. Les

quantités d'ADN apportées à chaque échantillon varient de 0,5 à 2 µg. Les résultats sont reportés dans la figure 6.

La transfection de 1.10^5 cellules en phase exponentielle de croissance avec 1 µg d'ADN plasmidique semble un bon choix ; en effet l'augmentation de la quantité d'ADN utilisé entraîne une augmentation de la concentration en lipide cationique au contact des cellules et donc des problèmes de toxicité dans certains cas. A plus faible concentration en ADN la proportionnalité avec l'efficacité de transfection n'est plus obtenue.

10

EXEMPLE 37

Essais de transfection in vivo avec des lipopolyamines selon l'invention.

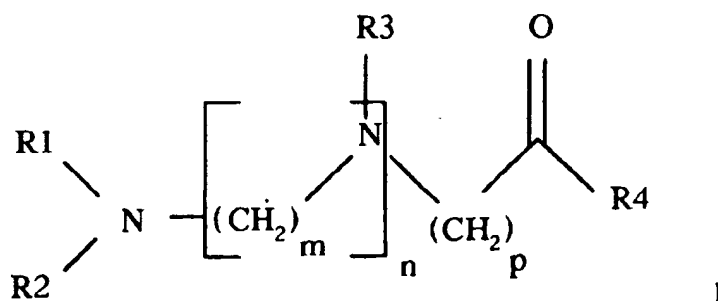
On procède à une injection d'une solution contenant une lipopolyamine selon l'invention, préparée comme décrit ci-dessus, dans la tumeur 7 jours après implantation, la souris étant anesthésiée avec un mélange Kétamine + Xylazine. Deux jours après l'injection, on prélève du tissu tumoral, qui est pesé puis haché et broyé dans 500 µl tampon de lyse (Promega Cell Lysis Buffer E153 A). Après centrifugation (20 000 g pendant 10 minutes), on prélève 10 µl qui servent à l'évaluation de l'activité luciférase par mesure de l'émission lumineuse totale obtenue après mélange avec 50 µl de réactif (Promega Luciferase Assay Substrate) dans un luminomètre Lumat LB 9501 (Berthold), intégration sur 10 secondes. L'activité résultante est exprimée en RLU (Relative Lights Units) estimés dans la totalité du surnageant de lyse tumorale, ou en RLU par µg d'ADN injecté. le tableau III rend compte des résultats obtenus.

Plasmide			Peptide		Lipide Cationique		Résultat,		n
référence	µg/ tumeur	[ADN] µg/µl	référence	pept/ADN w/w	référence	nmol/µg ADN	RLU /tumeur moyenne	écart-type	
pXL2622	10	0,5	(KTPKKAKKP),	1,5	(9)	3	679 258	414 286	9
pXL2622	10	0,5	«	«	(6)	«	395 433	219 333	10
pXL2622	10	0,5	«	«	(16)	«	67 994	82 527	8
pXL2622	10	0,5	«	«	(19)	«	59 209	54 375	9

TABLEAU III

REVENDEICATIONS

1. Lipopolyamine, sous forme D, L ou LD et ses sels, caractérisée en ce qu'elle
 5 est représentée par la formule générale I



Dans laquelle :

R1, R2 et R3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement $-(CH_2)_q-NRR'$ avec

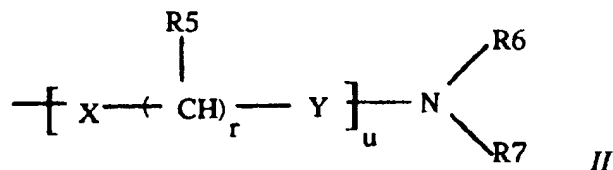
- 10 q pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R1, R2 et R3 et

R et R' représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement $-(CH_2)_{q'}-NH_2$, q' pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R et R',

- 15 m, n et p représentent, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier pouvant varier entre 0 et 6 avec lorsque n est supérieur à 1, m pouvant prendre des valeurs différentes et R3 des significations différentes au sein de la formule générale I et

R4 représente un groupement de formule générale II

59



dans laquelle:

R6 et R7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique, saturé ou non, en C10 à C22 avec au moins l'un des deux groupements étant différent de l'hydrogène,

u est un nombre entier choisi entre 0 et 10 avec lorsque u est un entier supérieur à 1 R5, X, Y et r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents motifs [X-(CHR5)_r-Y]

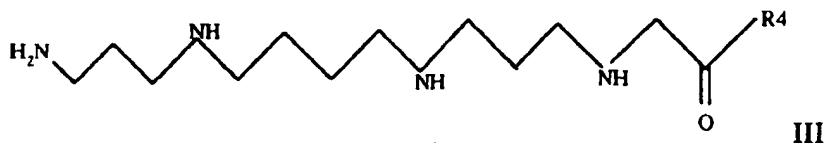
X représente un atome d'oxygène, de soufre ou un groupement amine monoalkylé ou non,

Y représente un groupement carbonyle ou un groupement méthylène

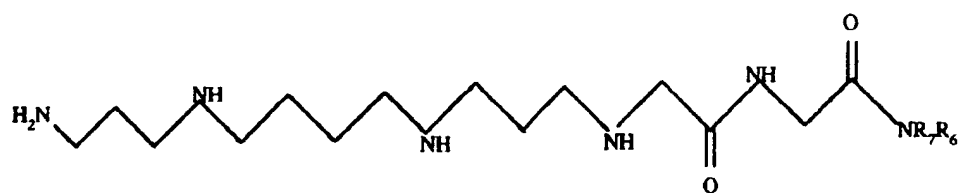
R5 représente un atome d'hydrogène ou une chaîne latérale d'acide aminé naturel, le cas échéant substituée et

r représente un entier variant entre 1 et 10 avec lorsque r est égal à 1, R5 représentant une chaîne latérale d'acide aminé naturel substitué ou non et lorsque r est supérieur à 1, R5 représentant un atome d'hydrogène.

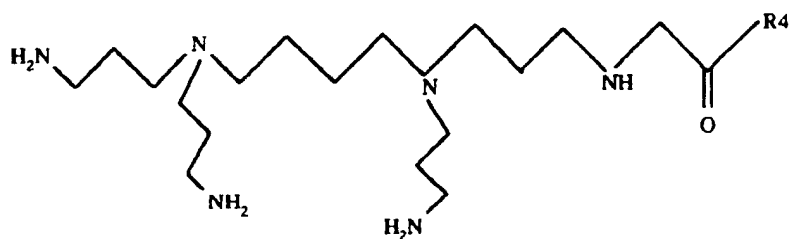
2. Lipopolyamine selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle est représentée par l'une des sous formules suivantes



60

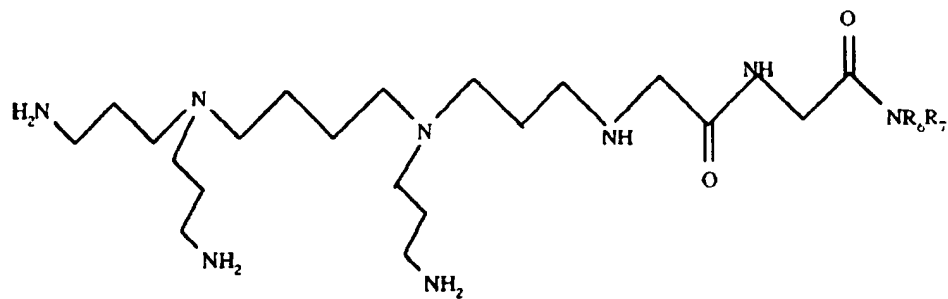


IV



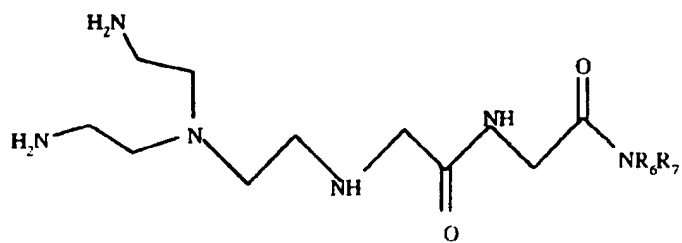
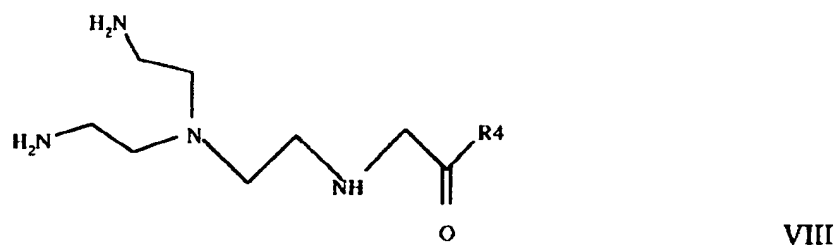
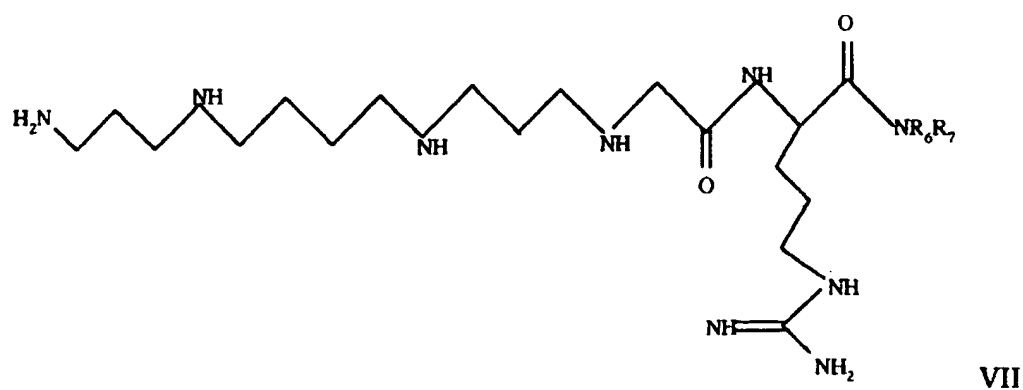
5

V

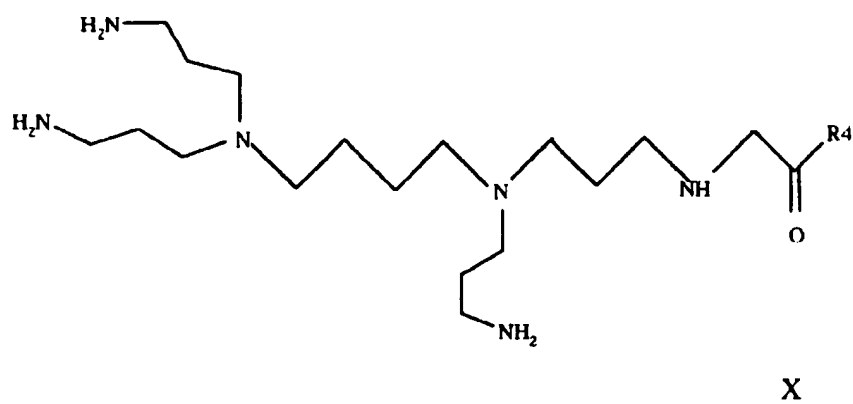


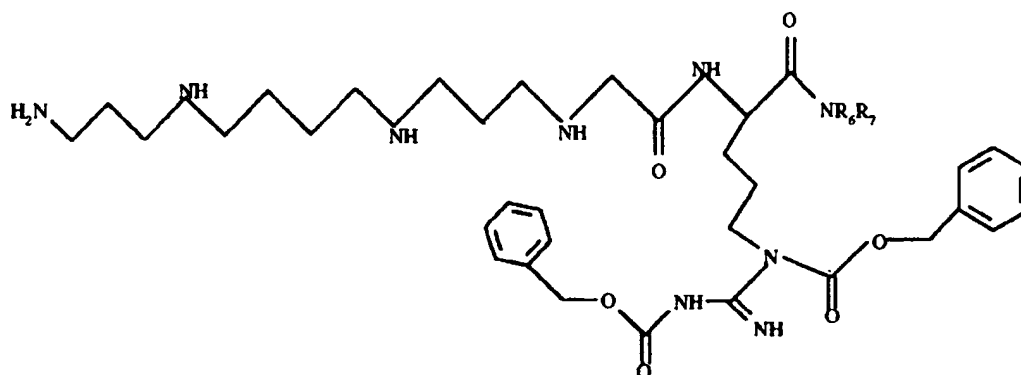
VI

61



5





XI

dans lesquelles R4, R6 et R7 sont définis comme en revendication 1.

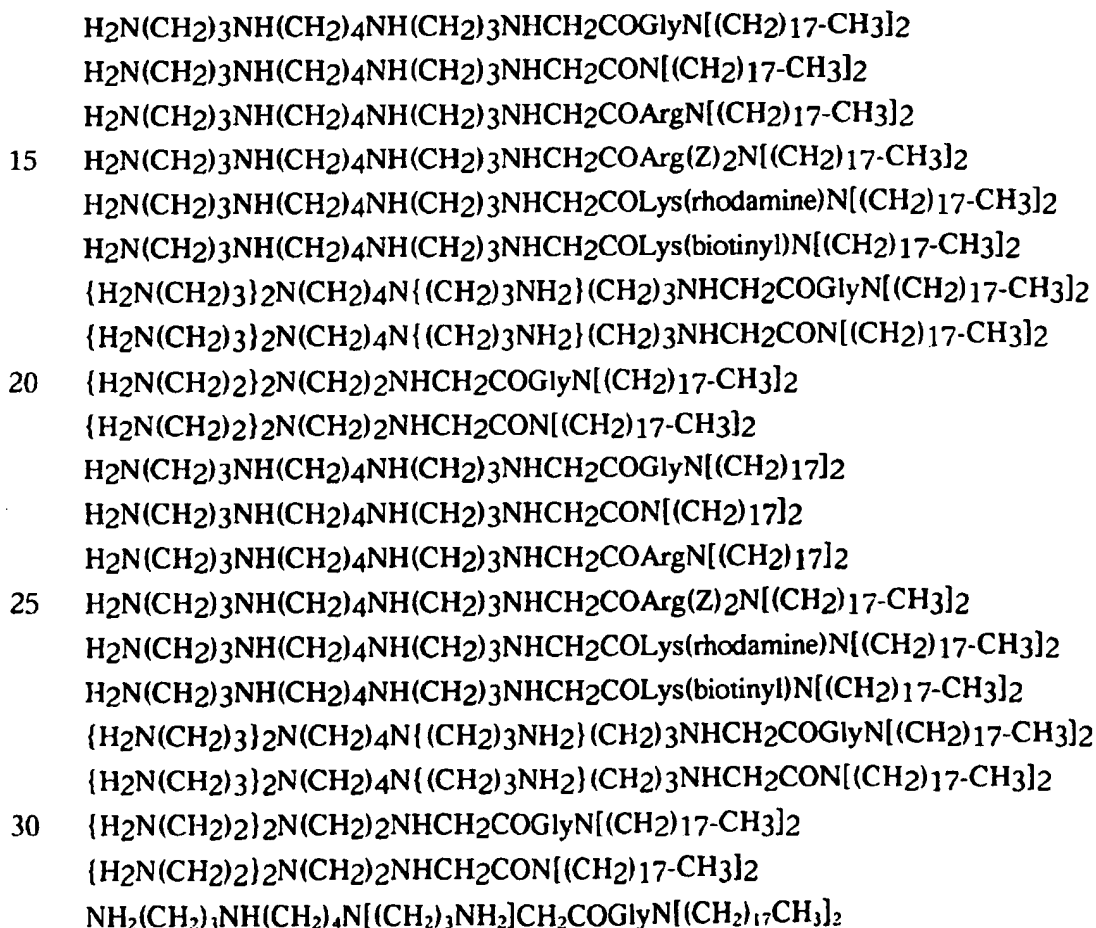
3. Lipopolyamine selon la revendication 2 caractérisée en ce que R4 y représente un groupement NR6R7 avec R6 et R7 figurant dans les sous formules III à XII un groupement identique choisi parmi $(CH_2)_{17} CH_3$, $(CH_2)_{11} CH_3$, $(CH_2)_{13} CH_3$ ou $(CH_2)_{12} CH_3$.
4. Lipopolyamine selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle est associée à un élément de ciblage extra ou intracellulaire.
5. Lipopolyamine selon la revendication 4 caractérisée en ce qu'elle incorpore l'élément de ciblage au niveau de la chaîne latérale d'acide aminé figurée par le substituant R5.
6. Lipopolyamine selon la revendication 4 ou 5 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un ligand de récepteur cellulaire présent à la surface du type cellulaire ciblé.
7. Lipopolyamine selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisée en ce que cet élément de ciblage est choisi parmi des sucres, des peptides tels que des anticorps ou fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des récepteurs ou fragments de récepteurs tels que des ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de lectines

cellulaires ou de récepteurs de protéines d'adhésion de type intégrines, de récepteur de la transferrine, des lipides HDL ou LDL et/ou des oligonucléotides.

8. Lipopolyamine selon l'une des revendications 4 ou 5 caractérisée en ce que cet élément de ciblage est représentée par une séquence signal de localisation nucléaire.

9. Lipopolyamine selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle incorpore un agent marqueur de type biotine, rhodamine, folate ou une séquence peptidique ou pseudopeptidique linéaire ou cyclique comportant l'épitope Arg-Gly-Asp au niveau de la chaîne latérale d'acide aminé figurée par R5.

10. Lipopolyamine selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :



- $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLysN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}[\text{Cl-Z}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}[\text{CHO}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}[\text{Cholesteryl}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
5 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys}[\text{Arachidonyl}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGluN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{O-Bz}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{Galactosamide}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
10 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{Glucosamide}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{Mannosamide}]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_5\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3]_2$
15 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3]_2$ et
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3]_2$.

11. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins
20 une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 10 et au moins un acide nucléique.

12. Composition selon la revendication 11 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.

13. Composition selon la revendication 11 caractérisée en ce que l'acide
25 nucléique est un acide ribonucléique.

14. Composition selon la revendication 11, 12 ou 13 caractérisée en ce que l'acide nucléique est modifié chimiquement.

15. Composition selon l'une des revendications 11 à 14 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un antisens.

16. Composition selon l'une des revendications 11 à 14 caractérisée en ce que
30 l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.

17 Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique, une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 6 et un adjuvant capable de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique et/ou d'améliorer son pouvoir transfectant.

18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce que l'adjuvant
5 est un ou plusieurs lipides neutres.

19. Composition selon la revendication 18 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi les lipides synthétiques ou naturels, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques.

20. Composition selon la revendication 19 caractérisée en ce que le ou les
10 lipides neutres sont des lipides à 2 chaînes grasses.

21. Composition selon la revendication 19 ou 20 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi la dioléoylphosphatidyléthanoline (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanoline (POPE), le di-stéaroyl, -palmitoyl, -miristoyl phosphatidyléthanoline ainsi que leurs dérivés N-méthylés 1 à 3 fois; les
15 phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérebrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) et les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

22. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 11 à
20 21 caractérisée en ce que l'adjuvant est ou comprend un composé intervenant au niveau de la condensation dudit acide nucléique

23. Composition pharmaceutique selon la revendication 22 caractérisée en ce que ledit composé dérive en tout ou partie d'une histone, d'une nucléoline et/ou d'une protamine.
25

24. Composition pharmaceutique selon la revendication 22 caractérisée en ce que ledit composé est constitué en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA) répétés de manière continue ou non, le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10.

25. Composition selon l'une des revendications 11 à 24 caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,01 à 20 équivalents d'adjuvant pour un équivalent d'acide nucléique en poids/poids et, plus préférentiellement, de 0,5 à 5.

5 26. Composition selon l'une quelconque des revendications 11 à 25 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.

27. Composition selon l'une quelconque des revendications 11 à 25 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.

10 28. Utilisation d'une lipopolyamine selon l'une des revendications de 1 à 10 pour la transfection in vivo ou in vitro de cellules.

15 29. Procédé d'une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il met en oeuvre le couplage d'au moins une fraction lipidique à au moins une fraction polyamine asymétrique, ladite fraction polyamine ayant au préalable été obtenue par réaction bimoléculaire entre un agent alkylant lié covalamment à un support solide et une polyamine symétrique.

20 30. Procédé selon la revendication 29 caractérisé en ce que le couplage de la fraction lipidique à la fraction polyamine asymétrique est effectuée au niveau du support solide auquel est fixée ladite fraction polyamine asymétrique et en ce que l'on récupère ladite lipopolyamine ainsi obtenue.

31. Procédé selon la revendication 30 caractérisé en ce qu'il met en outre en oeuvre l'introduction d'agents marqueurs, de sucres ou de sondes fluorescentes sur la lipopolyamine, fixée ou non sur le support solide.

1/6

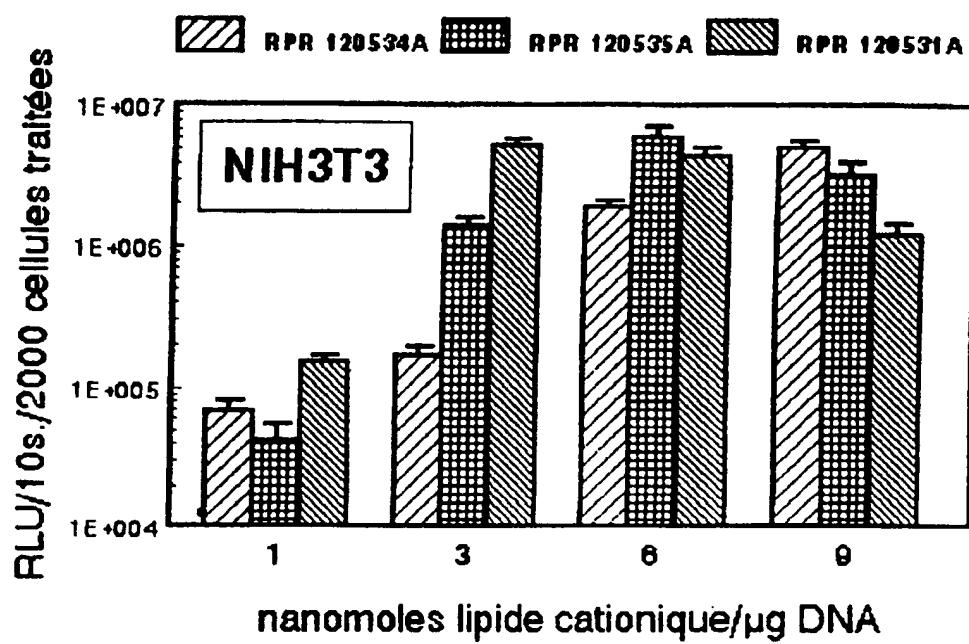


Figure 1

2/6

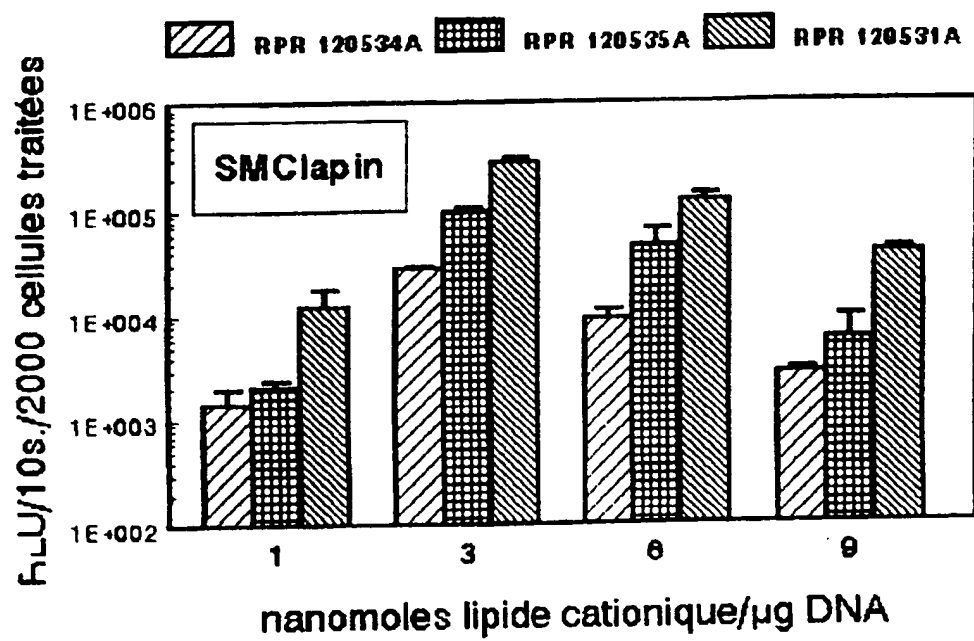


Figure 2

3/6

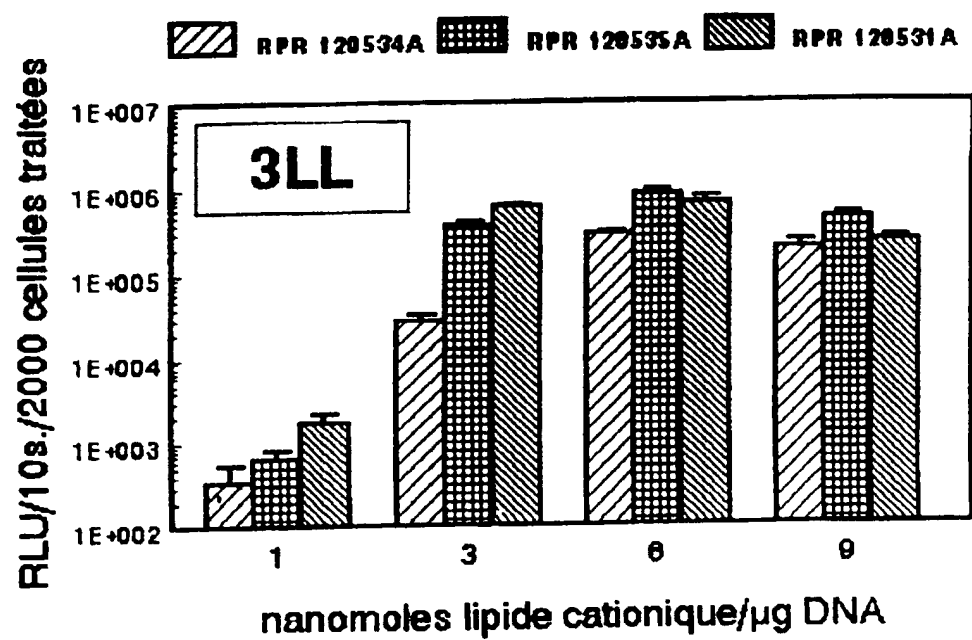


Figure 3

4/6

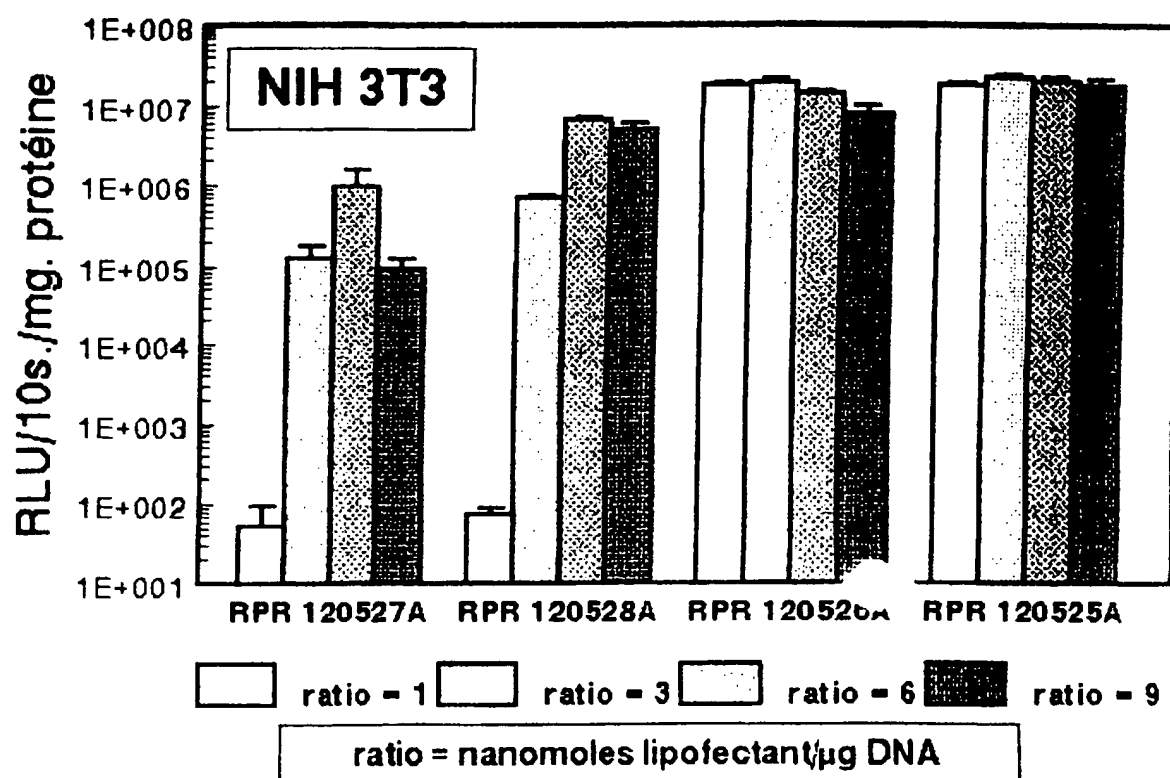


Figure 4

5/6

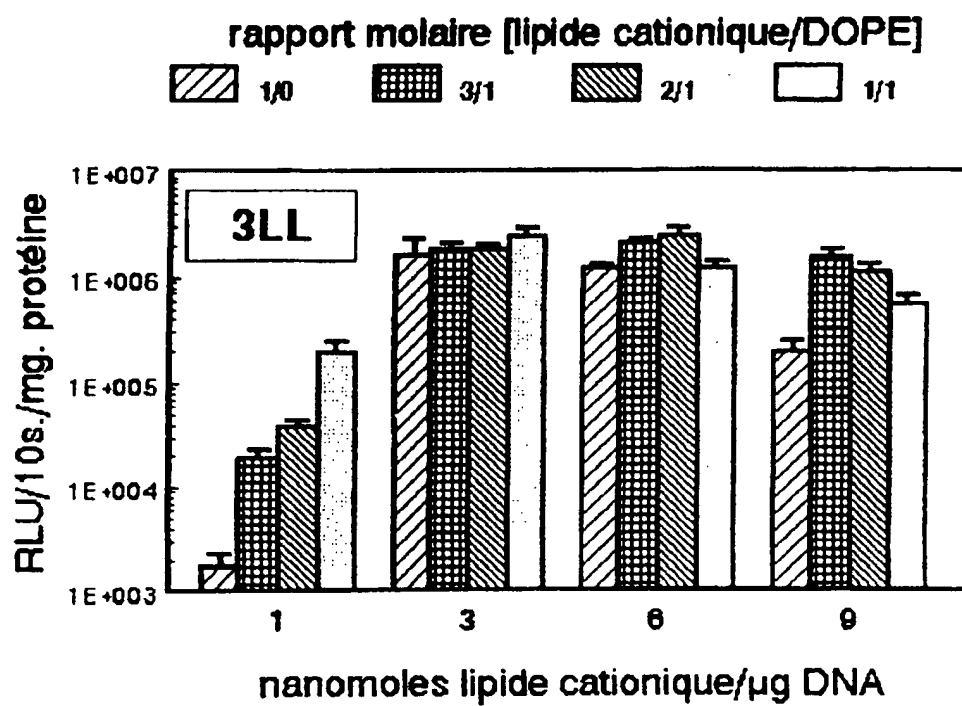


Figure 5

6/6

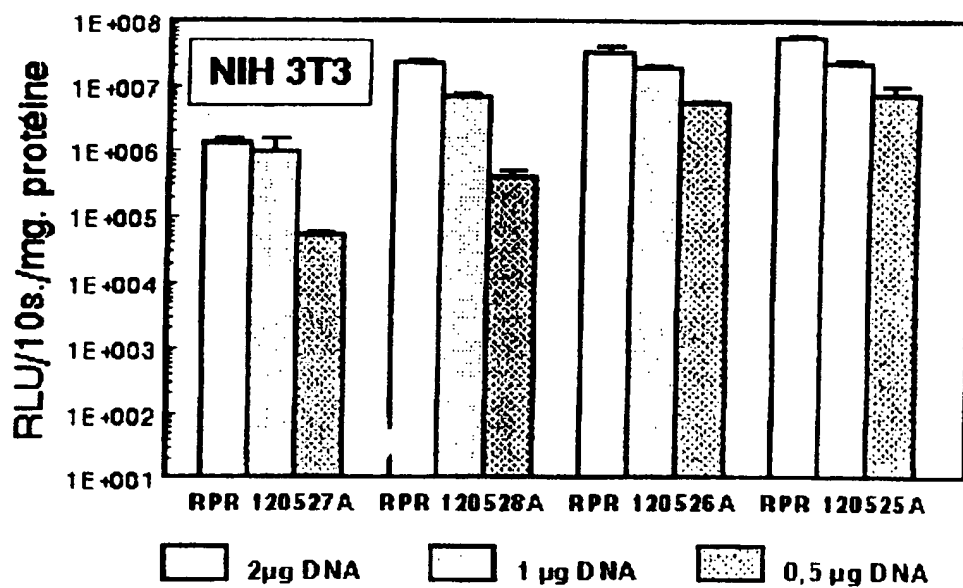


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/FR 96/01774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07C237/06 C07K5/06 A61K47/48 C12N15/87 C12N15/88
A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07C C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 394 111 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 24 October 1990 see claims; examples ---	1-3,10, 28
A	WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA ;BEHR JEAN PAUL (FR); DEMENEIX BARBARA (FR)) 13 July 1995 see claims 1,6-10,13-17,20-22 ---	1,11-21, 25-28
A	WO 94 05624 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 17 March 1994 see page 8, line 2 - line 19 ---	1,4-9,28
P,X	WO 96 25508 A (RHONE-POULENC RORER S.A., FR.) 22 August 1996 see page 11, line 13 - line 23; claims -----	1-31



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *B* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 1997

Date of mailing of the international search report

24.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seufert, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01774

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see annex
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01774

The large number of theoretically possible compounds resulting from the combination of all the claimed substituents prevents a complete search from being made for all the compounds according to claim 1. For reasons of economy, the search has been restricted to the following case:

the variables p and n of the general formula are the integer 1 or higher, m is the integer 2 or higher, and one of the substituents R1 and R2 is different from hydrogen.

(See Examination Guidelines, part B, chapter III, 3.6, 3.7).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat Application No

PCT/FR 96/01774

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0394111	24-10-90	FR-A- 2645866	19-10-90
		CA-A- 2014518	17-10-90
		FR-A- 2646161	26-10-90
		IL-A- 94077	29-12-94
		JP-A- 2292246	03-12-90
		US-A- 5476962	19-12-95
		US-A- 5171678	15-12-92

WO-A-9518863	13-07-95	FR-A- 2714830	13-07-95
		AU-A- 1458395	01-08-95
		CA-A- 2180872	13-07-95
		EP-A- 0738328	23-10-96
		FI-A- 962799	09-07-96
		NO-A- 962791	02-07-96
		ZA-A- 9500137	09-09-95

WO-A-9405624	17-03-94	US-A- 5334761	02-08-94
		EP-A- 0656883	14-06-95
		JP-T- 8509953	22-10-96

WO-A-9625508	22-08-96	FR-A- 2730637	23-08-96
		AU-A- 4835396	04-09-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 96/01774

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07C237/06 C07K5/06
A61K48/00

A61K47/48

C12N15/87

C12N15/88

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07C C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 394 111 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 24 Octobre 1990 voir revendications; exemples ---	1-3,10, 28
A	WO 95 18863 A (RHONE-POULENC RORER SA ;BEHR JEAN PAUL (FR); DEMENEIX BARBARA (FR)) 13 Juillet 1995 voir revendications 1,6-10,13-17,20-22 ---	1,11-21, 25-28
A	WO 94 05624 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 17 Mars 1994 voir page 8, ligne 2 - ligne 19 ---	1,4-9,28
P,X	WO 96 25508 A (RHONE-POULENC RORER S.A., FR.) 22 Août 1996 voir page 11, ligne 13 - ligne 23; revendications -----	1-31



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 Février 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24.02.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Seufert, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 96/01774

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n°
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir page suivante
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications: elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No. PCT/FR 96/ 01774

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/

Le nombre élevé de composés théoriquement concevables qui resultent de la combinaison de tous les substituants revendiqués empêche une recherche complète pour tous les composés selon revendication 1. Pour des raison d'économie la recherche a été limitée au cas suivant:

les variables p et n de la formule générale représentent un nombre entier égal ou supérieur à 1, m représente un nombre entier égal ou supérieur à 2 et l'un des substituants R1 et R2 est différent de l'hydrogène.

(voir Directives Relatives à l'Examen part B, chapitre III, 3.6, 3.7)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 96/01774

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0394111	24-10-90	FR-A- 2645866	19-10-90
		CA-A- 2014518	17-10-90
		FR-A- 2646161	26-10-90
		IL-A- 94077	29-12-94
		JP-A- 2292246	03-12-90
		US-A- 5476962	19-12-95
		US-A- 5171678	15-12-92

WO-A-9518863	13-07-95	FR-A- 2714830	13-07-95
		AU-A- 1458395	01-08-95
		CA-A- 2180872	13-07-95
		EP-A- 0738328	23-10-96
		FI-A- 962799	09-07-96
		NO-A- 962791	02-07-96
		ZA-A- 9500137	09-09-95

WO-A-9405624	17-03-94	US-A- 5334761	02-08-94
		EP-A- 0656883	14-06-95
		JP-T- 8509953	22-10-96

WO-A-9625508	22-08-96	FR-A- 2730637	23-08-96
		AU-A- 4835396	04-09-96
